

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-242600  
 (43)Date of publication of application : 19.09.1995

(51)Int.CI.

C07C 69/732  
 A61K 31/235  
 A61K 31/235  
 A61K 31/255  
 A61K 31/695  
 C07C 69/734  
 C07C219/22  
 C07C229/24  
 C07C317/22  
 C07K 5/065  
 C07K 5/068  
 C07K 5/08

(21)Application number : 06-060145

(71)Applicant : NAGAO YOSHIMITSU  
 SATO TOSHIO

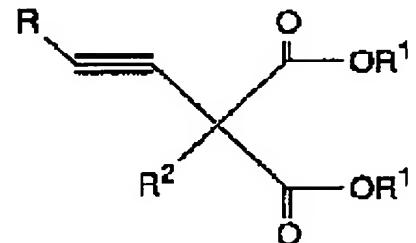
(22)Date of filing : 02.03.1994

(72)Inventor : NAGAO YOSHIMITSU  
 SATO TOSHIO  
 KATSUNUMA NOBUHIKO

## (54) THIOL PROTEASE INHIBITOR

## (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a thiolprotease inhibitor containing a 2-alkynylmalonic acid derivative and useful for treating osteoporosis and hypercalcemia.  
 CONSTITUTION: This inhibitor contains a compound of the formula (R is H, an aryl, an aralkyl, a cycloalkyl, a lower alkyl, etc.; R1 is H or a carboxyl- protecting group; R2 is hydroxy, a lower alkoxy, etc.) or its salt as an active ingredient. The compound of the formula has excellent cathepsin L-inhibiting activity and cathepsin B inhibiting activity and is useful for preventing and treating muscular dystrophy, inflammation, renal hypertension, cataract, cardiac infarction, viral diseases, malignant tumor, allergic diseases and especially useful as a treating agent for osteoporosis and hypercalcemia, due to inhibition of collagen-decomposing ability.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-242600

(43)公開日 平成7年(1995)9月19日

(51)Int.C1.

識別記号

F I

|             |             |
|-------------|-------------|
| C07C 69/732 | Z 9279-4H   |
| A61K 31/235 | ABJ 9454-4C |
|             | ADD 9454-4C |
| 31/255      | 9454-4C     |
| 31/695      |             |

審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全26頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平6-60145

(71)出願人 595054648

長尾 善光

徳島県徳島市名東町1丁目130番7号

(22)出願日 平成6年(1994)3月2日

(71)出願人 593200766

佐藤 利夫

徳島県徳島市丈六町長尾57番3号

(72)発明者 長尾 善光

徳島県徳島市名東町1丁目130番7号

(72)発明者 佐藤 利夫

徳島県徳島市丈六町長尾57番3号

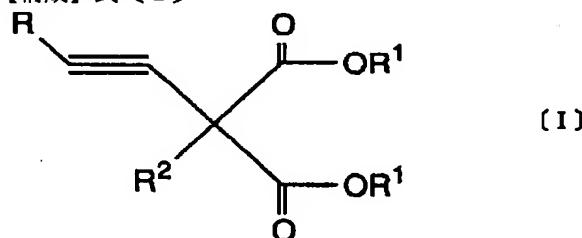
(72)発明者 勝沼 信彦

徳島県徳島市名東町3丁目246番2号

(54)【発明の名称】チオールプロテアーゼ阻害剤

(57)【要約】 (修正有)

【構成】式(I)



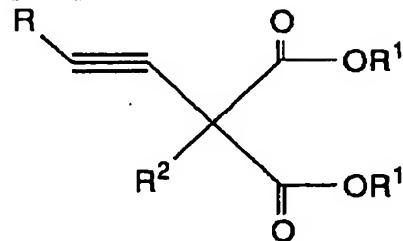
〔式中、Rは、水素原子、置換されてもよいアリール基若しくはアラルキル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、低級アルキル基又はトリ低級アルキルシリル基又は- $(CH_2)_n-OR'$ （ここで、nは1乃至4の整数を意味し、R'は水素原子、水酸基の保護基、5-ジメチルアミノ-1-ナフタレンスルホニル基、保護されてもよいアミノ酸残基又は置換されてもよいジ若しくはトリペプチド残基を意味する）を意味する〕で示される2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなるチオールプロテアーゼ阻害剤。

【効果】骨粗鬆症治療剤及び高カルシウム血症治療剤として有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】下記一般式〔I〕

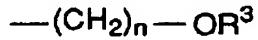
## 【化1】



〔I〕

〔式中、Rは、水素原子、置換されてもよいアリール基若しくはアラルキル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、低級アルキル基、トリ低級アルキルシリル基又は

## 【化2】

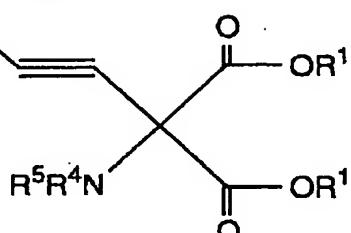
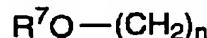


（ここで、nは1乃至4の整数を意味し、R'は水素原子、水酸基の保護基、5-ジメチルアミノ-1-ナフタレンスルホニル基、保護されてもよいアミノ酸残基又は置換されてもよいジ若しくはトリペプチド残基を意味する）を意味し、R'は水素原子又はカルボキシル保護基を意味し、R'はヒドロキシ基、低級アルコキシ基又は

## 【化3】



（ここで、R'は水素原子、低級アルキル基又はアミノ保護基を意味し、R'は水素原子、低級アルキル基、ア

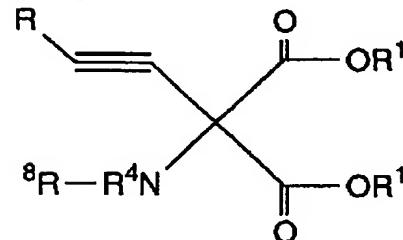


〔II〕

（式中、R'、R'、R'及びnは上記と同じであり、R'は保護されてもよいアミノ酸残基又は保護されてもよいジ若しくはトリペプチド残基を意味する）で示される2-アミノ-2-アルキニルマロン酸誘導体。

## 【請求項8】下記一般式〔IV〕

## 【化6】



〔IV〕

（式中、R、R'及びR'は上記と同じであり、R'は保護されてもよいアミノ酸残基又は保護されてもよいジ若

ミノ酸残基、保護されてもよいアミノ酸残基又は置換されてもよいジ若しくはトリペプチド残基を意味する）を意味する）で示される2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなるチオールプロテアーゼ阻害剤。

【請求項2】請求項1記載の2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなるカテプシンB阻害剤。

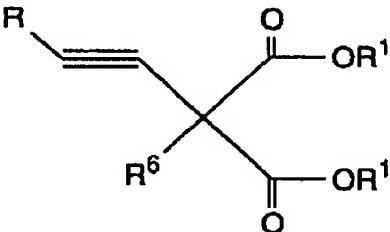
【請求項3】請求項1記載の2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなるカテプシンL阻害剤。

【請求項4】請求項1記載の2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなる骨粗鬆症治療剤。

【請求項5】請求項1記載の2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなる高カルシウム血症治療剤。

【請求項6】下記一般式〔II〕

## 【化4】

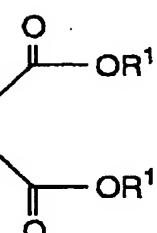


〔III〕

（式中、R及びR'は上記と同じであり、R'はヒドロキシ基、低級アルコキシ基を意味する）で示される2-ヒドロキシ-2-アルキニルマロン酸誘導体。

【請求項7】下記一般式〔III〕

## 【化5】



〔III〕

（式中、R'、R'、R'及びnは上記と同じであり、R'は保護されてもよいアミノ酸残基又は保護されてもよいジ若しくはトリペプチド残基を意味する）で示される2-置換アミノ-2-アルキニルマロン酸誘導体。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなるカテプシンL、カテプシンB等のチオールプロテアーゼ阻害剤に関するものであり、骨粗鬆症治療剤や高カルシウム血症治療剤等の医薬として有用である。また本発明はチオールプロテアーゼ阻害活性を有する新規2-アルキニルマロン酸誘導体に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】活性中心にチオール基を有する蛋白分解酵素はチオールプロテアーゼと総称されている。カテプシンL、カテプシンBは、カルシウム依存性中性プロテ

アーゼ (CAMP) 、パパイン、フィシン、プロメリン、プロメラン等とともに代表的なチオールプロテアーゼの一つである。そしてこれらチオールプロテアーゼに對して阻害作用を有する物質は、チオールプロテアーゼが関与するとされる疾患、例えば筋ジストロフィー症、炎症、腎性高血圧、白内症、心筋梗塞、ウイルス感染症、悪性腫瘍、骨粗鬆症、アレルギー疾患等の予防又は治療に有効であろうことが期待されている。また、近年に至り、勝沼等の研究によってカテブシンL、カテブシンBと骨粗鬆症乃至悪性腫瘍性高カルシウム血症の関係が解明され、それによって、とりわけカテブシンL阻害剤の骨粗鬆症治療剤乃至悪性腫瘍性高カルシウム血症治療剤としての医薬への適用が注目されつつある。(勝沼信彦「BIO media」7(6)、1992、73-77他)。骨組織においては、骨芽細胞 (osteoblast) による骨形成と、破骨細胞 (osteoclast) による骨吸収が生涯を通じて行われており、成長期には骨形成が骨吸収を上回ることにより骨重量が増加し、一方老年期には逆に骨吸収が骨形成を上回るために骨重量が減少し、骨粗鬆症の発症となる。これら骨粗鬆症の原因としては様々なものがあるが、特に骨崩壊 (骨吸収) を主原因の一つとして挙げることができる。これを更に2つの原因に分けると次のようになる。即ち、一つはカルシウムの吸収と沈着不全に起因するものであり、更に詳しくはカルシウムの供給量、転送、吸収、及び沈着が関係するものであり、ビタミンD誘導体、女性ホルモン (エストロゲン) 等が関与していると考えられる。いま一つは、骨支持組織であるコラーゲンの分解促進を内容とするものであり、破骨細胞内リソゾームから分泌されるチオールプロテアーゼ群、中でも特にカテブシンL、カテブシンBによる骨コラーゲン分解が主たる原因である。破骨細胞内のリソゾームから分泌されたこれらカテブシンL及びBは骨組織中のコラーゲンの分解を促進し、それによって古い骨は溶解され、ヒドロキシプロリンとともにカルシウムが血中に遊離放出させられる。従って、カテブシンL及びBのコラーゲン分解能を阻害することによって過剰な骨崩壊を防止することが可能であり、ひいては骨粗鬆症の治療が可能となる。これら骨粗鬆症の治療剤としては、エストロゲン、タンパク同化ホルモン、カルシウム剤、ビタミンD、カルシトニン、あるいはビスホスホネート等が知られているが、本発明のごとき、カテブシンL阻害、カテブシンB阻害のいわゆるチオールプロテアーゼ阻害を作用機序とする骨粗鬆症治療剤は知られていない。

【0003】一方、高カルシウム血症は、血清中のカルシウム濃度が正常値以上となる代謝異常であり、腫瘍患者に多く見受けられる。これを放置した場合、患者の寿命は10日程度であると言われている。原因の多くは腫瘍の骨転移である。腫瘍が骨に転移すると、骨破壊が起こり、カルシウムが血中に放出される。このカルシウム

は腎臓で処理されるが、骨破壊のスピードが腎臓の処理能力を上回ったとき、高カルシウム血症の発現となる。治療方法としては、フロセミドを併用した生理的食塩水の輸液を用いることにより腎臓からのカルシウム排泄を促進する方法や、骨粗鬆症治療薬であるカルシトニンを使用する方法等が知られている。即ち、骨吸収を抑制するがごとき骨粗鬆症治療薬は悪性腫瘍性高カルシウム血症の治療剤としても有効であるといえる。しかしながら、本発明のごときカテブシンL阻害、カテブシンB阻害を作用機序とする高カルシウム血症治療薬は知られていない。なお、本発明の医薬の有効成分である2-アルキニルマロン酸誘導体のうちのある種の化合物は既に我々が発表したところであり(「日本薬学会第112年会」1992)、また出願したところである(特願平4-260583)。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のとおり、骨粗鬆症に対する治療方法は種々知られているが、実際に臨床の場で行われているのは食事や運動による体質改善や、ビタミンD<sub>3</sub>、カルシトニン投与のみである。また悪性疾患(例えは、多発性骨髄腫、肺癌等)の末期にみられる悪性高カルシウム血症は致命的であるにもかかわらず、その治療法は補液を基本としたグルココルチコイドとカルシトニンの併用等を行うのみである。このように骨粗鬆症や悪性高カルシウム血症の治療法は未だ十分といえるものではなく、新たな作用機序に基づく新しい治療薬の出現が望まれている。そこで、本発明者等はカテブシンL乃至カテブシンBと骨崩壊の関係に注目し、鋭意研究を行った結果、2-アルキニルマロン酸誘導体が優れたカテブシンL阻害活性、カテブシンB阻害活性を有することを見い出し、本発明を完成するに至った。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、下記のごとき、チオールプロテアーゼ阻害剤、カテブシンL阻害剤、カテブシンB阻害剤、骨粗鬆症治療剤、高カルシウム血症治療剤に関するものであり、また、ある種の新規2-アルキニルマロン酸誘導体に関するものである。

## (1) 下記一般式(I)

## 【0006】

## 【化1】

【0007】〔式中、Rは、水素原子、置換されてもよいアリール基若しくはアラルキル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、低級アルキル基、トリ低級アルキルシリル基又は

## 【0008】

## 【化2】

【0009】(ここで、nは1乃至4の整数を意味し、R'は水素原子、水酸基の保護基、5-ジメチルアミノ-1-ナフタレンスルホニル基、保護されてもよいアミノ酸残基又は置換されてもよいジ若しくはトリペプチド

残基を意味する)を意味し、R'は水素原子又はカルボキシル保護基を意味し、R'はヒドロキシ基、低級アルコキシ基又は

【0010】

【化3】

【0011】(ここで、R'は水素原子、低級アルキル基又はアミノ保護基を意味し、R'は水素原子、低級アルキル基、アミノ酸残基、保護されてもよいアミノ酸残基又は置換されてもよいジ若しくはトリペプチド残基を意味する)を意味する)で示される2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなるチオールプロテアーゼ阻害剤。

【0012】(2)上記(1)記載の2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなるカテプシンB阻害剤。

【0013】(3)上記(1)記載の2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなるカテプシンL阻害剤。

【0014】(4)上記(1)記載の2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなる骨粗鬆症治療剤。

【0015】(5)上記(1)記載の2-アルキニルマロン酸誘導体又はその塩を含有してなる高カルシウム血症治療剤。

【0016】(6)下記一般式[II]

【0017】

【化4】

【0018】(式中、R及びR'は上記と同じであり、R'はヒドロキシ基、低級アルコキシ基を意味する)で示される2-ヒドロキシ-2-アルキニルマロン酸誘導体。

【0019】(7)下記一般式[III]

【0020】

【化5】

【0021】(式中、R'、R'、R'及びnは上記と同じであり、R'は保護されてもよいアミノ酸残基又は保護されてもよいジ若しくはトリペプチド残基を意味する)で示される2-アミノ-2-アルキニルマロン酸誘導体。

【0022】(8)下記一般式[IV]

【0023】

【化6】

【0024】(式中、R、R'及びR'は上記と同じであり、R'は保護されてもよいアミノ酸残基又は保護されてもよいジ若しくはトリペプチド残基を意味する)で示される2-置換アミノ-2-アルキニルマロン酸誘導体。

【0025】なお、本明細書中における置換基に関する用語の意味は下記の通りである。「アリール基」とは、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、ビフェ

ニル基等の芳香族炭化水素基を意味し、好ましくはフェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基であり、特に好ましくはフェニル基である。「アラルキル基」とは、ベンジル基、フェネチル基等のフェニル低級アルキル基を意味し、特に好ましくはベンジル基である。これら「アリール基」、「アラルキル基」はメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基等の低級アルキル基；水酸基；メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基等の低級アルコキシ基等の置換基の1つ以上で置換されてもよい。「シクロアルキル基」とは、炭素数3乃至7の飽和脂肪族炭化水素環であり、具体的には、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロベンチル基、シクロヘキシル基又はシクロヘプチル基を意味する。好ましくはシクロプロピル基、シクロブチル基、シクロベンチル基、シクロヘキシル基であり、特に好ましくは、シクロベンチル基、シクロヘキシル基である。「シクロアルケニル基」とは、上記のごときシクロアルキル基の飽和脂肪族炭化水素環中の少なくとも1対の隣接炭素原子が二重結合で結ばれた、例えばシクロベンテンニル基、シクロヘキセニル基等を意味する。「低級アルキル基」とは、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基等の、直鎖又は分岐の炭素数1乃至4のアルキル基を意味する。これら「アルキル基」は、メルカブト基、カルボキシ基、低級アルコキシカルボニル基等の置換基で置換されてもよい。「水酸基の保護基」とは、加水分解又は水素添加分解により離脱することのできるものであれば如何なるものでもよいが、特に好ましくはテトラヒドロピラニル基である。「トリ低級アルキルシリル基」とは、例えばトリメチルシリル基、トリエチルシリル基である。「カルボキシル保護基」とは、カルボキシル基を実質的に保護するようなものなら如何なるものでもよいが、特に好ましくはメチル基、エチル基等の低級アルキル基又はアラルキル基である。「アミノ保護基」とは、通常のアミノ酸化学の分野で用いられるアミノ保護基であり、アミノ基又はイミノ基を諸反応から保護するものであれば、いかなる保護基も採用し得る。例えば、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、トリフルオロアセチル基等の置換又は非置換の低級アルカノイル、ベンジル基、フタロイル基、tert-ブロキシカルボニル基(Boc)等の低級アルコキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基(Z)等のアリールオキシカルボニル基、ベンゼンスホニル基、トリル基等のアリールスルホニル基、トリチル基、ベンジル基等のアラルキル基を挙げることができる。「低級アルコキシ基」とは、炭素数1乃至4の直鎖又は分岐のアルコキシ基であり、例えばメトキシ基、エトキシ基、プロピオキシ基、ブロキシ基等であり、好ましくはメトキシ基、エトキシ基である。「アミノ残基」とは、アミノ酸のカルボキシル基から水酸基がはずれた形の残基であり、例えばL-Arg等を挙げ

することができる。これらアミノ残基は、Boc、Mts (2, 4, 6-トリメチルベンゼンスルホニル基等のアミノ保護基で保護されていてもよい。「ジ若しくはトリペプチド残基」とはジペプチド、トリペプチドのC末端のカルボキシル基から水酸基がはずれた形の残基であり、例えばL-Phe-L-Arg-、L-Arg-L-Arg-等を挙げることができる。これらアミノ残基は、Boc (t-ブトキシカルボニル基)、Mts (2, 4, 6-トリメチルベンゼンスルホニル基)等のアミノ保護基で保護されていてもよい。

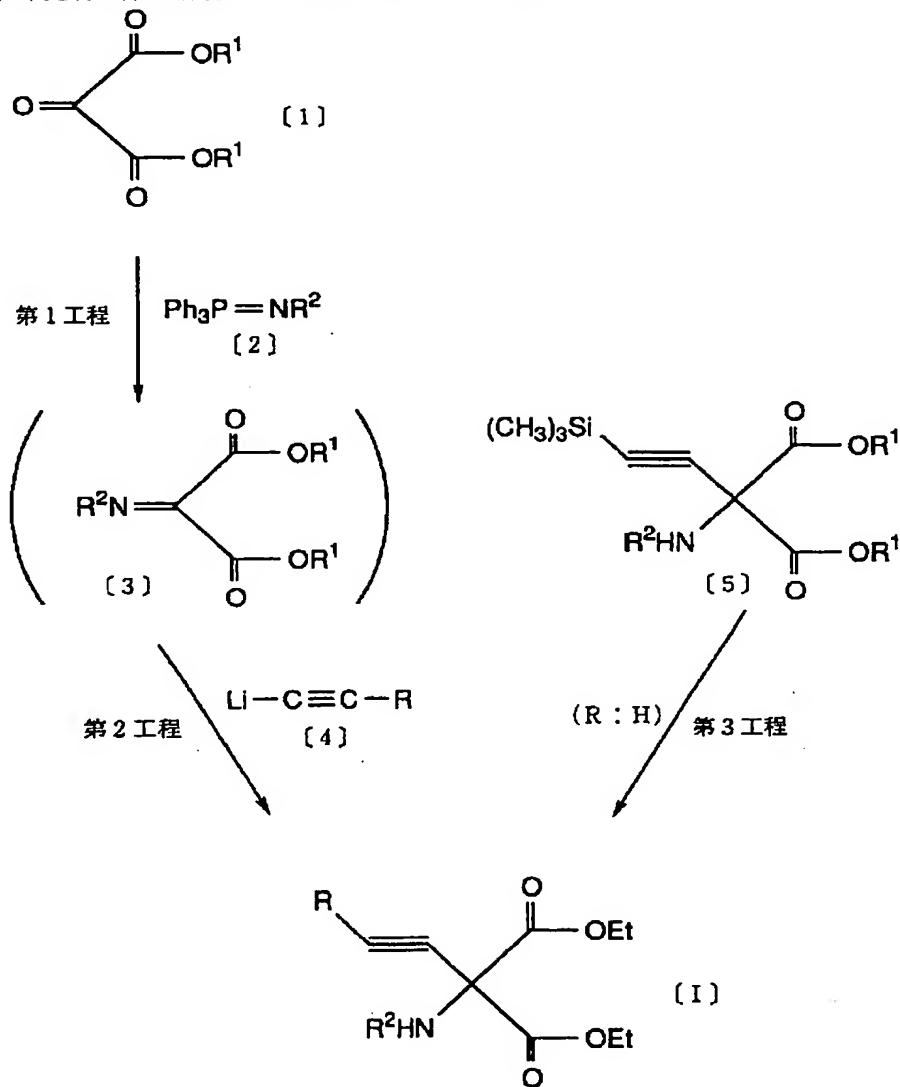
【0026】次に、本発明に係る新規2-アルキニルマ

ロン酸誘導体〔I〕の製造方法について、一般的製造方法と具体的な製造例を以て述べるが、これら誘導体〔I〕の製造は下記方法に限定されるものでないことは勿論である。また、より詳しくは個々の製造例を参考にするとよい。

製造方法1 (Rが水素原子、置換されてもよいアリール基若しくはアラルキル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、低級アルキル基又はトリ低級アルキルシリル基の場合)

10 【0027】

【化7】



【0028】(第1工程) 化合物〔3〕の製造

この工程自体は、アザーピッティヒ (aza-Wittig) 反応としてよく知られている (Tetrahedron Lett., 22 (46), 4607 (1981))。化合物〔1〕は、ケトマロン酸のジエステル体であり、例えばジエチル ケトマロン酸エステル、ジメチル ケトマロン酸エステル、ジベンジル ケトマロン

酸エステル、ジフェナセチル ケトマロン酸エステル等を挙げることができる。化合物〔2〕は、アセチル基、tert-ブトキシカルボニル基 (Boc)、ベンジルオキシカルボニル基 (Z)、p-ニトロベンジルオキシカルボニル基等のアミノ保護基 ( $\text{R}'$ ) で保護されてなるイミノトリフェニルホスフィンであり、好ましくはアセチルイミノトリフェニルホスフィンである。化合物

〔3〕は、化合物〔2〕を無水テトラヒドロフラン(THF)、無水ジオキサン等の有機溶媒に溶解させた後、更に同溶液中に1当量の化合物〔1〕を加え、不活性ガス雰囲気下で数時間乃至数十時間反応させることによって得ることができる。

【0029】(第2工程) 化合物〔I〕の製造

化合物〔I〕は、第1工程で得られた化合物〔3〕を単離し、又は単離することなくそのままリチウムアセチライド〔4〕と不活性ガス雰囲気下、-10°C~-80°Cの条件下に反応させてアルキニル化することによって得られる。リチウムアセチライド〔4〕は、例えば対応する置換基R(Rは前記のとおり)を有するアセチレン誘導体をn-ブチルリチウムと無水THF、無水エーテル、無水ジメトキシエタン等の有機溶媒中で交換反応に付することにより容易に得ることができる。なお、R基としてヒドロキシ置換低級アルキル基、例えば2-ヒドロキシエチル基を有する化合物〔I〕を望む場合は、化合物〔4〕としてLi-C≡C-C<sub>1</sub>H<sub>n</sub>-O-保護基(テトラヒドロピラニル基、メトキシメチル基、ベンジル基、p-ニトロベンジル基等)のごときを用いて、反応させた後、これを脱保護すればよい。

【0030】

10

20

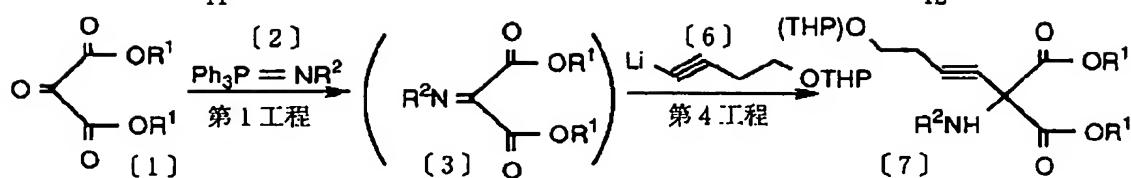
(第3工程) 化合物〔I〕(但し、R=-H)の製造  
前記第1工程及び第2工程の方法に従ってトリメチルシリルエチニル基を有する化合物〔5〕、例えばエチル2-アセトアミド-2-エトキシカルボニル-4-トリメチルシリル-3-ブチニ酸エステルを得た後、脱シリル化することにより容易にトリメチルシリル基を脱離させて、Rが-Hである目的化合物〔I〕を得ることができる。具体的には、化合物〔5〕をTHF、ジオキサン、アセトン等の非反応性の極性有機溶媒に溶解させ、不活性ガス雰囲気下、20°C乃至-80°C、好ましくは-80°Cで、1当量乃至2当量の酸の存在下に反応させることによりトリメチルシリル基を脱離することができる。好ましい酸としては、酢酸、シュウ酸、クエン酸等の有機酸、または塩酸等の無機酸を挙げることができる。特に好ましいのは酢酸であり、この場合更にテトラブチルアンモニウムフルオリド等の四級アミンのフッ素塩を併用することにより好結果が得られる。

【0031】製造方法2〔Rが-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OR'(n、R'は上記のとおり)の場合〕

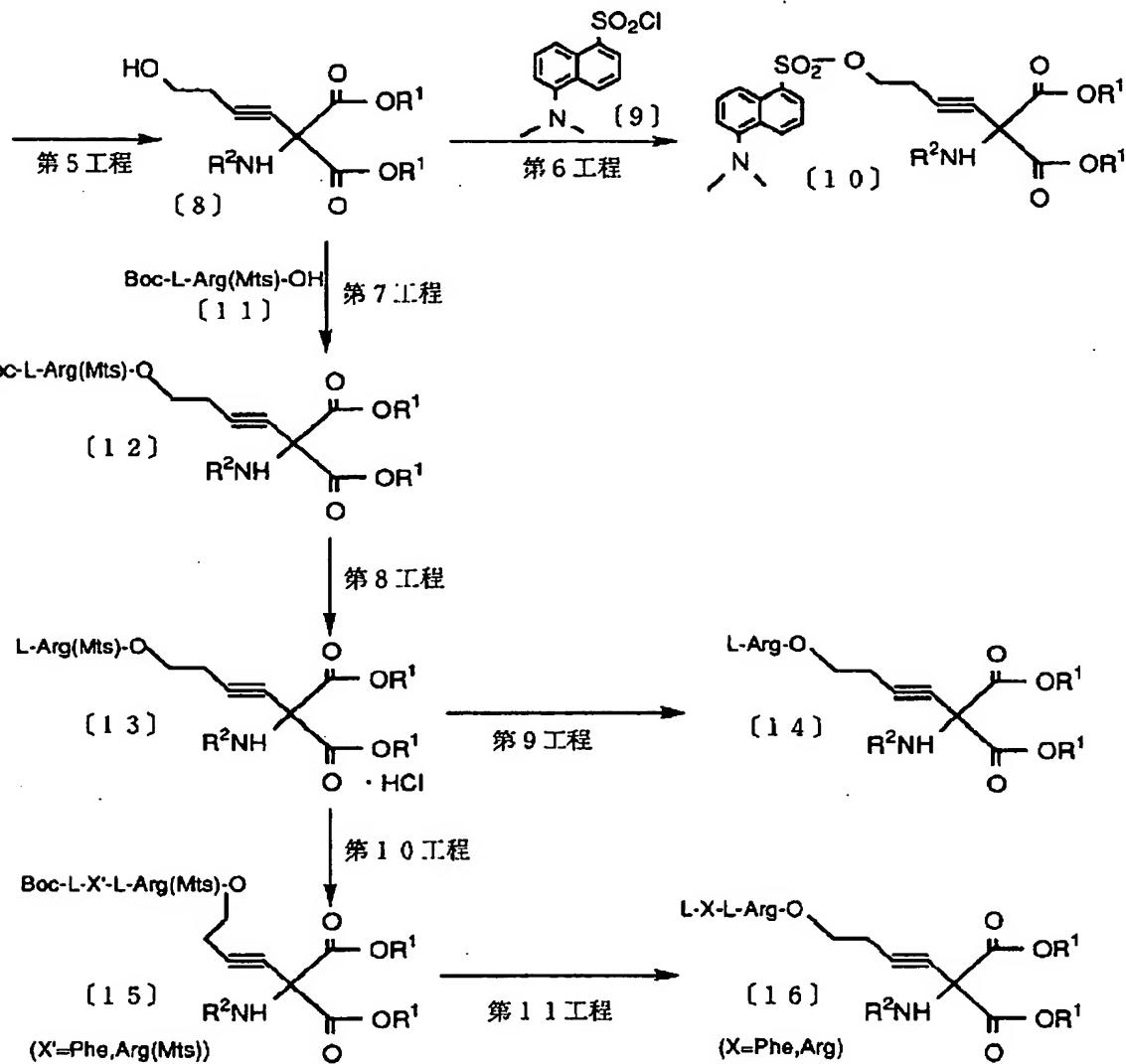
【0032】

【化8】

11



12



## 【0033】(第4工程) 化合物〔7〕の製造

R<sup>1</sup>が水酸基の保護基、例えばTHP(テトラヒドロピラン-2-イル)であるような化合物〔7〕の製造方法である。化合物〔7〕は前記第1工程で得られた化合物〔3〕にリチオ体化合物〔6〕を室温乃至冷却下で反応させることによって得られる。

## 【0034】(第5工程) 化合物〔8〕の製造

第4工程で得られた化合物〔7〕を酢酸-テトラヒドロフラン-水からなる混合溶媒に溶解させ、室温乃至加温下で反応させることによって得られる。

## 【0035】(第6工程) 化合物〔10〕の製造

化合物〔8〕の無水テトラヒドロフラン溶液にメチルリチウムのエーテル溶液を加え、これを好ましくは窒素雰囲気下、冷却下に攪拌した後、ダンシルクロリド〔9〕

を加えて室温で反応させることにより得られる。

【0036】以下第11工程までは、アミノ酸又はペプチド置換体を製造する方法である。

## 40 (第7工程) 化合物〔12〕の製造

第5工程で得られたヒドロキシ化合物〔8〕の無水塩化メチレン溶液とDCC(ジシクロヘキシカルボジイミド)等の縮合剤の存在下、好ましくはジメチルアミノリジン等の塩基の存在下にBoc-L-Arg(Mts)-OH(化合物〔11〕)を反応させることによって得られる。

## 【0037】(第8工程) 化合物〔13〕の製造

第7工程で得られた化合物〔12〕の保護基であるBoc(t-ブトキシカルボニル基)を脱離する工程である。化合物〔12〕にトリフルオロ酢酸を加え、攪拌し

た後、これを留去し、さらに塩酸ジオキサン溶液に溶解し、攪拌反応させることによって得られる。

【0038】(第9工程) 化合物〔14〕の製造

化合物〔13〕に残存するMts(2,4,6-トリメチルベンゼンスルホニル基)を脱離してアミノ酸置換化合物を得る工程である。化合物〔13〕をトリフルオロ酢酸等の有機溶媒に溶解させ、これにチオアニソールを加え室温で反応させ、さらに塩酸ジオキサン溶液に溶解し、攪拌反応させることによって得られる。

【0039】(第10工程) 化合物〔15〕の製造

アミノ酸置換化合物〔13〕を原料として、さらに別のアミノ酸を反応させてジペプチド体を得るための工程である。反応自体は通常のペプチド合成反応を用いればよい。化合物〔13〕とBoc(t-ブロトキシカルボニル

基)で保護したBoc-L-Phe-OH又はBoc-L-Arg(Mts)-OHを縮合剤の存在下に反応させることによって得られる。

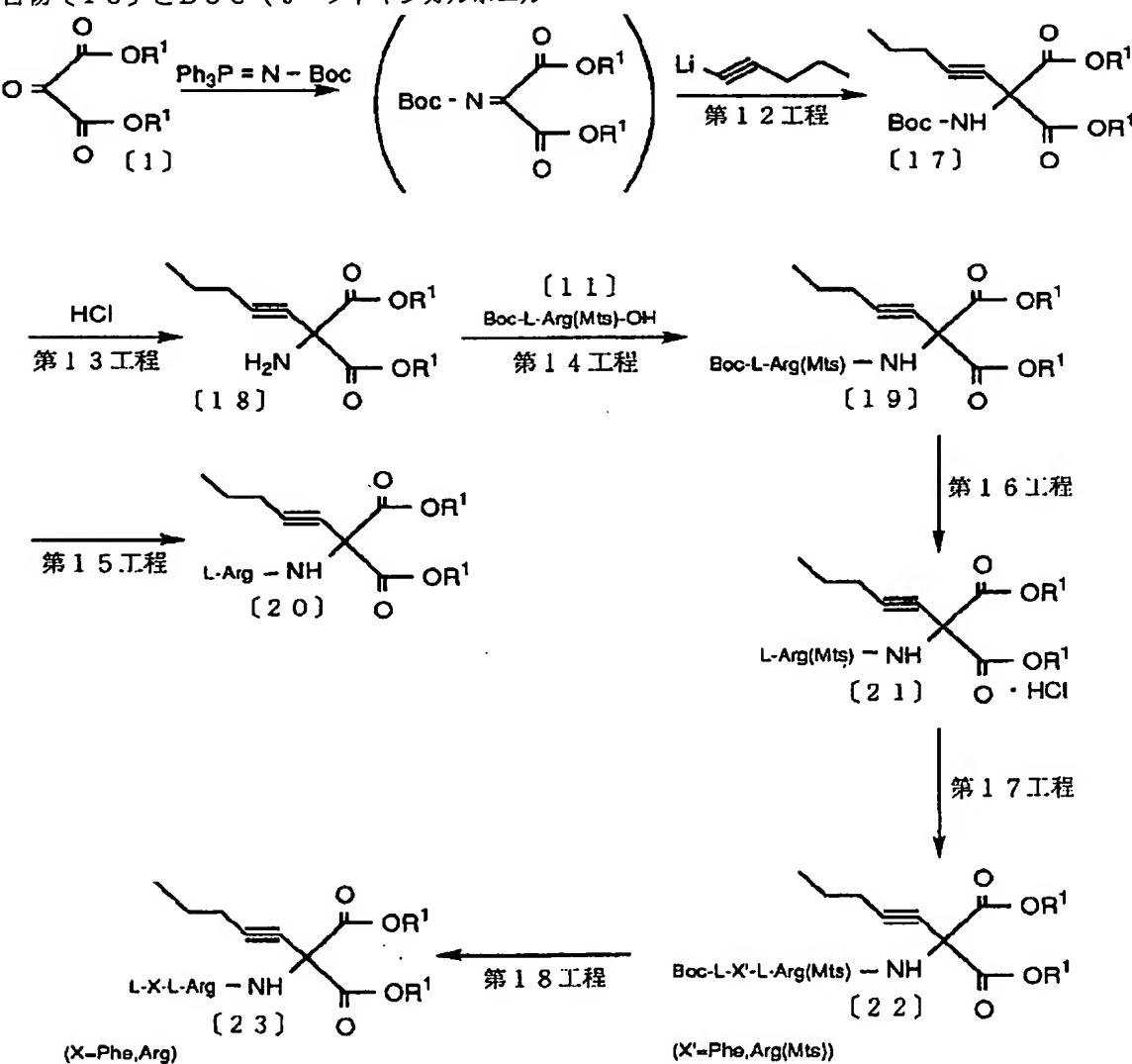
【0040】(第11工程) 化合物〔15〕の保護基の脱離

化合物〔15〕をトリフルオロ酢酸等の有機溶媒に溶解させ、これにチオアニソールを加え室温で反応させ、さらに塩酸ジオキサン溶液に溶解し、攪拌反応させることによって得られる。

【0041】製造方法3 (2-t-ブロトキシカルボキシミド置換体の製造)

【0042】

【化9】



【0043】(第12工程) 化合物〔17〕の製造  
t-ブロトキシカルボニル-イミノ-トリフェニルホスフィンを用いる以外は第1工程、第2工程と全く同様である。

【0044】(第13工程) 化合物〔18〕の製造

第12工程で得られた化合物〔17〕に塩酸ジオキサン溶液を加え、好ましくは冷却下乃至室温下で攪拌反応させることによって得られる。

【0045】(第14工程) 化合物〔19〕の製造  
通常のペプチド合成反応を利用することによって得られ

る。より具体的には、縮合剤の存在下に化合物〔18〕に保護されたアミノ酸、例えばBoc-L-Arg(Mts)-OH(化合物〔11〕)を反応させることによって得られる。

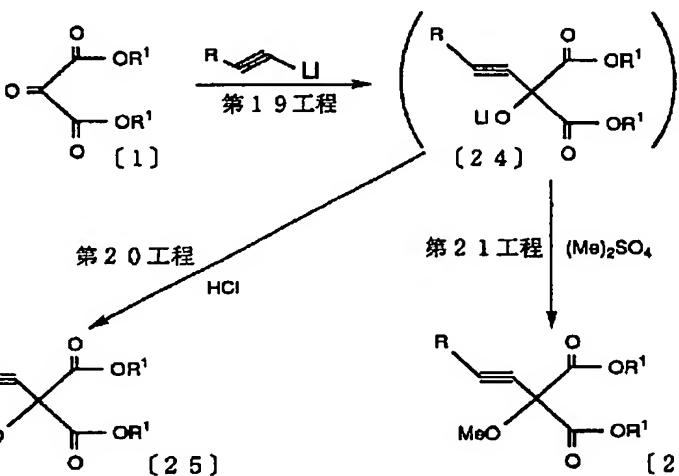
【0046】(第15工程) 化合物〔19〕の保護基の脱離

第14工程で得られた化合物〔19〕の保護基の脱離反応であり、第11工程と同様の方法に従えばよい。

【0047】(第16工程) 化合物〔21〕の製造

化合物〔19〕の保護基の脱離反応であり、第8工程と同様の方法に従えばよい。

10



【0052】(第19~21工程) リチウム化合物〔24〕は化合物〔1〕に有機溶媒中でリチウムフェニルアセチライドと反応させることによって得られる。2位に水酸基を有する化合物〔25〕を所望の場合は、化合物〔24〕に塩酸等の酸を反応させればよいし、また2位に低級アルキル基を有する化合物〔26〕を所望の場合

30

は化合物〔24〕にジメチル硫酸を反応させればよい。

【0053】本発明における一般式〔I〕で示される化合物は例えば下記表1乃至び表4に示すとおりである。

【0054】

【表1】

は化合物〔24〕にジメチル硫酸を反応させればよい。

【0048】(第17工程) 化合物〔22〕の製造  
化合物〔21〕から第10工程と同様にして得ることができる。

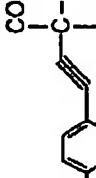
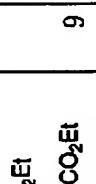
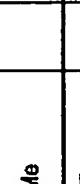
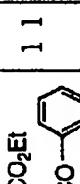
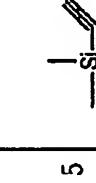
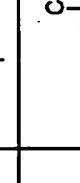
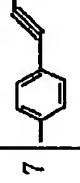
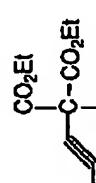
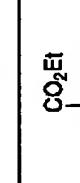
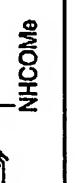
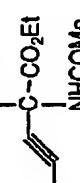
【0049】(第18工程) 化合物〔23〕の製造  
第17工程で得られた化合物〔22〕の保護基の脱離反応であり、第11工程と同様の方法に従えばよい。

【0050】製造方法4(2位ヒドロキシ又は低級アルコキシ置換体化合物の製造)

【0051】

【化10】

1

| 化合物番号 | 構造式   | 化合物番号 | 構造式   | 化合物番号 | 構造式   | 構造式   |
|-------|---|-------|---|-------|---|---|
| 1     |    | 5     |    | 9     |    |    |
| 2     |    | 6     |    | 10    |    |    |
| 3     |    | 7     |    | 11    |    |    |
| 4     |  | 8     |  | 12    |  |  |

【0055】

【表2】

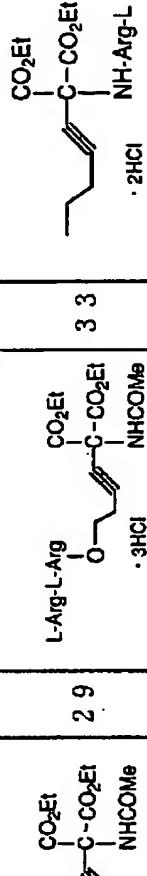
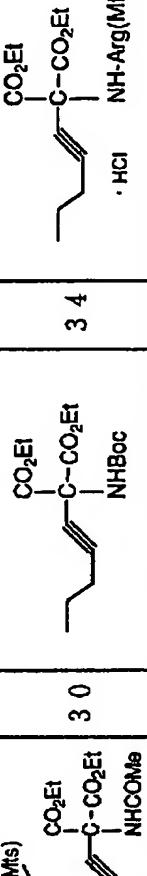
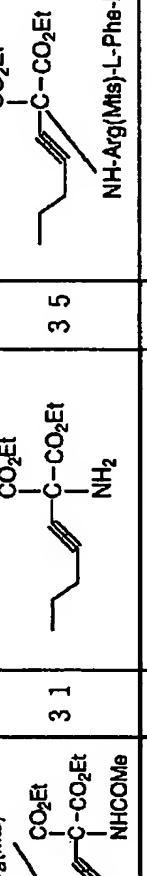
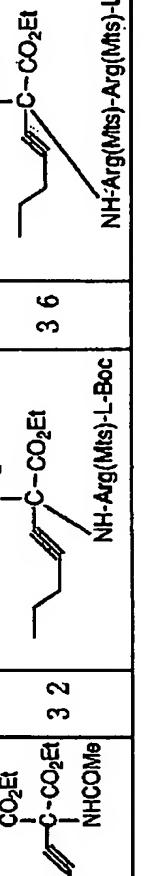
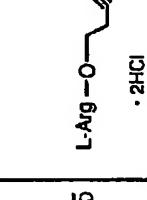
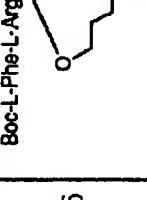
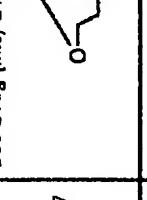
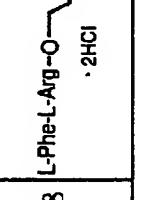
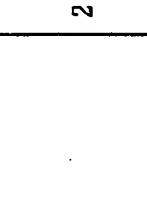
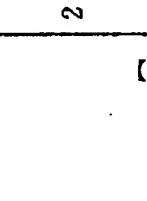
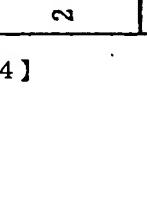
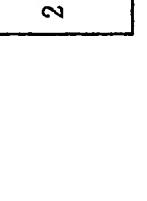
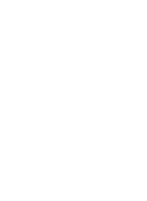
表2

| 化合物番号 | 構造式 | 化合物番号 | 構造式 | 化合物番号 | 構造式 |
|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
| 1 3   |     | 1 7   |     | 2 1   |     |
| 1 4   |     | 1 8   |     | 2 2   |     |
| 1 5   |     | 1 9   |     | 2 3   |     |
| 1 6   |     | 2 0   |     | 2 4   |     |

【0056】

【表3】

表3

| 化合物番号 | 構造式   | 化合物番号 | 構造式   | 化合物番号 | 構造式  | 構造式   |
|-------|---|-------|---|-------|--|---|
| 2 5   |   | 2 9   |   | 3 3   |   |   |
| 2 6   |  | 3 0   |  | 3 4   |  |  |
| 2 7   |  | 3 1   |  | 3 5   |  |  |
| 2 8   |  | 3 2   |  | 3 6   |  |  |

【0057】

【表4】

表 4

| 化合物<br>番号 | 構造式   | 化合物<br>番号 | 構造式 | 構造式 | 構造式 | 構造式 |
|-----------|---|-----------|-----|-----|-----|-----|
| 3 7       | $  \begin{array}{c}  \text{CO}_2\text{Et} \\    \\  \text{C} \equiv \text{C} \\    \\  \text{C}-\text{CO}_2\text{Et} \\  \cdot 2\text{HCl}  \end{array}  \text{NH-Arg-L-Phe-L}  $ |           |     |     |     |     |
| 3 8       | $  \begin{array}{c}  \text{CO}_2\text{Et} \\    \\  \text{C} \equiv \text{C} \\    \\  \text{C}-\text{CO}_2\text{Et} \\  \cdot 3\text{HCl}  \end{array}  \text{NH-Arg-L-Arg-L}  $ |           |     |     |     |     |

【0058】次に、これら化合物の具体的製造方法について述べる。

### 製造例 1

エチル 2-アセチルアミノ-2-エトキシカルボニル-4-フェニル-3-ブチノエート  
 アセチルアミノ-トリフェニルホスフィン (1.500g、4.69mmol) を無水テトラヒドロフラン (40ml) に溶解し、室温にてジエチルケトマロナート (0.7ml、4.69mmol) を加え窒素雰囲気下攪拌した後、得られた淡黄色の溶液を 10 時間加熱還流した。次いでフェニルアセチレン (0.515mg、4.69mmol) を *n*-ブチルリチウムのヘキサン溶液 (2.80ml、4.69mmol) と反応させて調製したリチウムフェニルアセチライドを先の反応溶液に窒素雰囲気下、-78 °C にて加え 1 時間攪拌した。3 時間後、5% 塩酸 (4ml) を加えることによって、反応を終結させ、

反応液を室温まで昇温させた後、エーテル (50ml × 3) で抽出し、エーテル層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (40ml)、飽和食塩水 (40ml) で洗浄後、無水硫酸マグ

40 減圧留去し、カラムクロマトグラフ法（エーテル-*n*-ヘキサン（5:1））にて精製し、淡黄色油状の標記化合物（1.000g、収率68%）を得た。

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.33 (6H, t, J=7.1 Hz), 2.10 (3H, s), 4.36 (4H, q, J=7.1 Hz), 7.04 (1H, brs), 7.21–7.52 (5H, m);

<sup>13</sup>CNMR(100MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$  13.88, 22.80, 60.72, 63.71, 82.47, 84.70, 121.87, 128.15, 128.86, 132.16, 165.08, 168.73; IR(neat)3362, 2985, 2239, 1752, 1673, 1491cm<sup>-1</sup>

理論値  $C_1, H_1, N_0$  : C, 64.34; H, 6.03; N, 4.41, 測定値 C, 6

## 【 0 0 5 9 】 製造例 2

エチル 2-アセチルアミノ-2-エトキシカルボニル-4-p-トルイル-3-ブチノエート  
p-トリルアセチレンを製造例 1 と同様の反応に付し、無色針状晶の標記化合物を得た。

融点: 132~133°C

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.32(6H, t, J=7.1Hz), 2.09(3H, s), 2.33(3H, s), 4.35(4H, q, J=7.1Hz), 7.04(1H, brs), 7.10(2H, AB, J<sub>AB</sub>=8.3Hz), 7.37(2H, AB, J<sub>AB</sub>=8.3Hz);  
<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.89, 21.53, 22.85, 60.73, 63.68, 81.74, 84.96, 118.79, 128.89, 132.08, 139.03, 165.18, 168.68;

IR(KBr)3363, 2985, 2238, 1757, 1682, 1505cm<sup>-1</sup>

理論値 C, H, N: C, 65.24; H, 6.39; N, 4.23, 測定値 C, 64.84; H, 6.56; N, 4.11

## 【 0 0 6 0 】 製造例 3

エチル 2-アセチルアミノ-2-エトキシカルボニル-4-(1-シクロヘキセン-1-イル)-3-ブチノエート

1-シクロヘキセン-1-イルアセチレンを製造例 1 と同様の反応に付し、無色針状晶の標記化合物を得た。

融点: 82°C

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.30(6H, t, J=7.1Hz), 1.50-1.80(4H, m), 2.06(3H, s), 2.00-2.35(4H, m), 4.32(4H, q, J=7.1Hz), 6.17-6.28(1H, m), 6.93(1H, brs), ;

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.88, 21.36, 22.13, 22.86, 25.63, 28.71, 60.60, 63.57, 79.64, 86.61, 119.54, 137.07, 165.29, 168.54;

IR(KBr)3251, 2215, 1752, 1656, 1510cm<sup>-1</sup>

理論値 C, H, N: C, 63.52; H, 7.22; N, 4.36, 測定値 C, 63.39; H, 7.25; N, 4.12

## 【 0 0 6 1 】 製造例 4

エチル 2-アセチルアミノ-2-エトキシカルボニル-3-ヘプチノエート

1-ペンチンを製造例 1 と同様の反応に付し、白色粉状の標記化合物を得た。

融点: 53~54°C

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.97(3H, t, J=7.3Hz), 1.30(6H, t, J=7.1Hz), 1.48-1.60(2H, m), 2.06(3H, s), 4.31(4H, q, J=7.1Hz), 6.94(1H, brs), ;

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.33, 13.86, 20.80, 21.67, 22.79, 60.28, 63.49, 73.84, 86.01, 165.45, 168.68;

IR(neat)3370, 2968, 2875, 2247, 1752, 1668, 1505, 1370, 1268, 1125, 1016cm<sup>-1</sup>

理論値 C, H, N: C, 59.33; H, 7.47; N, 4.95, 測定値 C, 59.40; H, 7.54; N, 4.72

## 【 0 0 6 2 】 製造例 5

エチル 2-アセチルアミノ-2-エトキシカルボニル-4-トリメチルシリル-3-ブチノエート

トリメチルシリルアセチレンを製造例 1 と同様の反応に

付し、無色針状晶の標記化合物を得た。

融点: 97°C

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.18(9H, s), 1.30(6H, t, J=7.1Hz), 2.06(3H, s), 4.31(2H, q, J=7.1Hz), 4.32(2H, q, J=7.1Hz), 6.88(1H, brs), ;

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.34, 14.13, 23.14, 61.00, 63.91, 90.84, 97.85, 165.22, 168.82;

IR(KBr)3286, 2986, 2239, 1752, 1671, 1490cm<sup>-1</sup>

理論値 C, H, N: C, 53.65; H, 7.40; N, 4.47, 測定値 C, 53.39; H, 7.53; N, 4.22

## 【 0 0 6 3 】 製造例 6

エチル 2-アセチルアミノ-2-エトキシカルボニル-3-ブチノエート

製造例 5 で得られた化合物 (0.157mg, 0.5mmol) を無水テトラヒドロフラン (12ml) に溶解し、酢酸 (0.057ml, 1mmol) 及びテトラブチルアンモニウムフルオライドの無水テトラヒドロフラン溶液 (1mmol, 1.0M) 1ml を加え、窒素雰囲気下、-78°Cで 3 時間攪拌した。反応液を室温まで昇温させた後、酢酸エチル (40ml × 3) で抽出し、酢酸エチル層を水 (20ml)、飽和食塩水 (20ml) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。ろ過後、褐色の残渣が得られるまで減圧留去し、カラムクロマトグラフ法 (エーテル-n-ヘキサン (5:1)) にて精製し、白色個体の標記化合物 (0.095g、収率80%) を得た。

融点: 125°C

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.31(6H, t, J=7.1Hz), 2.08(3H, s), 2.56(1H, s), 4.34(4H, q, J=7.1Hz), 6.95(1H, brs), ;

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.82, 22.72, 60.03, 63.93, 73.31, 76.92, 164.56, 168.87;

IR(neat)3282, 2120, 1769, 1659, 1515cm<sup>-1</sup>

理論値 C, H, N: C, 54.75; H, 6.27; N, 5.81, 測定値 C, 54.41; H, 6.30; N, 5.73

## 【 0 0 6 4 】 製造例 7

エチル 2-ペンゾイルアミノ-2-エトキシカルボニル-4-p-トルイル-3-ブチノエート

ペンゾイルイミノトリフェニルホスフィン (0.381g, 1mmol) を無水テトラヒドロフラン (10ml) に溶解し、室温にてジエチルケトマロナート (0.15ml, 1mmol) を加え窒素雰囲気下攪拌した。得られた淡黄色の溶液を 20 時間加熱還流した後、-78°Cまで冷却した。次いでこの溶液に p-トリルアセチレン (0.15ml, 1.2mmol) と n-ブチルリチウム (1.61M) のヘキサン溶液 (0.75ml, 1.2mmol) を 0°Cで 30 分間反応させて調製したリチウム-p-トリルアセチリドの無水テトラヒドロフラン (5ml) 溶液を加えた。3 時間後、5% 塩酸 (4ml) を加えることによって、反応を終結させ、反応液を室温まで昇温させた後、エーテル (50ml) で希釈した。得られたエーテル層を水 (15ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (15ml)、飽和食塩水 (15ml) で洗浄後、無水硫酸マ

グネシウムで脱水した。減圧濃縮して、トリフェニルホスフィン酸化物の結晶と共に得られた黄色油状物 (0.679g) をカラムクロマトグラフ法 (エーテル-n-ヘキサン (2:1) ) にて精製し、淡黄色油状の標記化合物 (0.042g、収率11%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.34(6H, t, J=7.1Hz), 2.36(3H, s), 4.39(4H, q, J=7.1Hz), 7.07(2H, AB, J<sub>AB</sub>=8.3Hz), 7.36(2H, AB, J<sub>AB</sub>=8.3Hz), 7.41-7.54(3H, m), 7.69(1H, s), 7.86-7.90(2H, m);

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.92, 21.52, 61.01, 63.75, 77.2, 85.16, 118.83, 127.38, 128.62, 128.86, 132.11, 132.99, 139.00, 165.26, 165.56;

IR(neat) 3418, 2982, 2238, 1751, 1674, 1603, 1581, 1509, 1473, 1369, 1269, 1207, 1097, 1070cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub> MW:393.1576, 測定値 m/z:393.1571

#### 【 0 0 6 5 】 製造例 8

エチル 2-ブタノイルアミノ-2-エトキシカルボニル-4-p-トルイル-3-ブチノエート

ブタノイルイミノトリフェニルホスフィン (0.521g、1.5mmol) を無水テトラヒドロフラン (15ml) に溶解し、室温にてジエチルケトマロナート (0.23ml、1.5mmol) を加え窒素雰囲気下攪拌した。得られた淡黄色の溶液を12時間加熱還流した後、-78°Cまで冷却した。次いでこの溶液に、p-トルイルアセチレン (0.23ml、1.8mmol) とn-ブチルリチウム (1.61M) のヘキサン溶液 (1.12ml、1.8mmol) を0°Cで30分間反応させて調製したリチウム-p-トルイルアセチリドの無水テトラヒドロフラン (10ml) 溶液を加えた。3時間後、5%塩酸 (4ml) を加えることによって、反応を終結させ、反応液を室温まで昇温させた後、エーテル (80ml) で希釈した。得られたエーテル層を水 (20ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20ml)、飽和食塩水 (20ml) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して得られた褐色油状物 (1.4g) をカラムクロマトグラフ法 (エーテル-n-ヘキサン (2:3) ) にて精製し、白色固体の標記化合物 (0.942g、収率62%)を得た。

融点: 60.5~61°C

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.98(3H, t, J=7.3Hz), 1.32(6H, t, J=7.1Hz), 1.56-1.58(2H, m), 2.28(2H, t, J=7.3Hz), 2.34(3H, s), 4.35(4H, q, J=7.1Hz), 6.98(1H, s), 7.08(2H, AB, J<sub>AB</sub>=8.1Hz), 7.34(2H, AB, J<sub>AB</sub>=8.1Hz);

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.54, 13.88, 18.89, 21.52, 37.8, 2,38.14, 60.65, 63.61, 81.94, 84.82, 118.89, 128.89, 132.05, 138.98, 165.22, 171.57;

IR(KBr) 3387, 3034, 2973, 2872, 2236, 1911, 1763, 1688, 1484, 1389, 1364, 1287, 1161, 1097, 1044, 1016cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub> MW:359.1733, 測定値 m/z:359.1753

#### 【 0 0 6 6 】 製造例 9

エチル 2-メトキシ-2-エトキシカルボニル-4-p-トルイル-3-ブチノエート

ジエチルケトマロナート (0.76ml、5mmol) の無水テトラヒドロフラン (10ml) 溶液に、p-トルイルアセチレン (0.63ml、5mmol) とn-ブチルリチウム (1.63M) のヘキサン溶液 (3.07ml、5mmol) を0°Cで30分間反応させて調製したリチウム-p-トルイルアセチリドの無水テトラヒドロフラン (20ml) 溶液を窒素雰囲気下、-78°Cにて滴下した。2時間後、ジメチル硫酸 (0.49ml、5mmol) を滴下した後、反応液を室温まで1時間かけて昇温し、次いで加熱還流した。3.5時間後、反応液を室温まで冷却し、エーテル (80ml) で希釈した。得られたエーテル層を水 (30ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (30ml)、飽和食塩水 (30ml) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して得られた褐色油状物 (1.4g) をカラムクロマトグラフ法 (エーテル-n-ヘキサン (2:3) ) にて精製し、白色固体の標記化合物 (0.942g、収率62%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.33(6H, t, J=7.1Hz), 2.36(3H, s), 3.58(3H, s), 4.34(4H, q, J=7.1Hz), 7.12(2H, AB, J<sub>AB</sub>=8.3Hz), 7.39(2H, AB, J<sub>AB</sub>=8.3Hz);

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.99, 21.54, 54.37, 62.97, 79.8, 7,80.08, 89.52, 118.30, 129.10, 132.07, 139.58, 165.40; IR(neat) 2984, 2232, 1752, 1510, 1447, 1368, 1255, 1109, 1035cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> MW:304.1311, 測定値 m/z:304.1295

#### 【 0 0 6 7 】 製造例 10

エチル 2-メトキシ-2-エトキシカルボニル-4-フェニル-3-ブチノエート

ジエチルケトマロナート (0.46ml、3mmol) の無水テトラヒドロフラン (10ml) 溶液に、フェニルアセチレン (0.33ml、3mmol) とn-ブチルリチウム (1.63M) のヘキサン溶液 (1.84ml、3mmol) を0°Cで30分間反応させて調製したリチウム-フェニルアセチリドの無水テトラヒドロフラン (15ml) 溶液を窒素雰囲気下、-78°Cにて滴下した。2時間後、ジメチル硫酸 (0.28ml、3mmol) を滴下した後、反応液を室温まで1時間かけて昇温し、次いで加熱還流した。3.5時間後、反応液を室温まで冷却し、エーテル (80ml) で希釈した。得られたエーテル層を水 (30ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (30ml)、飽和食塩水 (30ml) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフ法 (エーテル-n-ヘキサン (2:3) ) にて精製し、黄色油状の標記化合物 (0.454g、収率52%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.34(6H, t, J=7.1Hz), 3.60(3H, s), 4.35(4H, q, J=7.1Hz), 7.27-7.38(3H, m), 7.50-7.55(2H, m);

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14.12, 54.44, 62.98, 80.06, 80.58, 89.31, 121.42, 128.39, 129.35, 132.20, 165.35;  
IR(neat) 2984, 2833, 2233, 1752, 1491, 1446, 1391, 1369, 1255, 1110, 1034cm<sup>-1</sup>  
HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O, MW: 290.1154, 測定値 m/z: 290.1158

## 【0068】製造例 1 1

エチル 2-メトキシ-2-エトキシカルボニル-4-(1-シクロヘキセン-1-イル)-3-ブチノエートジエチルケトマロナート(0.763ml, 5mmol)の無水テトラヒドロフラン(10ml)溶液に、1-シクロヘキセン-1-イルアセチレン(0.59ml, 5mmol)とn-ブチルリチウム(1.61M)のヘキサン溶液(3.11ml, 5mmol)を0°Cで30分間反応させて調製したリチウム-1-シクロヘキセニルアセチリドの無水テトラヒドロフラン(20ml)溶液を窒素雰囲気下、-78°Cにて滴下した。2時間後、ジメチル硫酸(0.47ml, 5mmol)を滴下した後、反応液を室温まで1時間かけて昇温し、次いで加熱還流した。3.5時間後、反応液を室温まで冷却し、エーテル(80ml)で希釈した。得られたエーテル層を水(30ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(30ml)、飽和食塩水(30ml)で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラ法(エーテル-n-ヘキサン(2:3))にて精製し、黄色油状の標記化合物(0.911g、収率62%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.31(6H, t, J=7.1Hz), 1.46-1.72(4H, m), 1.97-2.21(4H, m), 3.51(3H, s), 4.31(4H, q, J=7.1Hz), 6.20-6.32(1H, m);

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.98, 14.02, 21.35, 22.12, 25.70, 28.71, 54.23, 62.80, 77.74, 80.02, 91.31, 119.38, 137.73, 165.57;

IR(neat) 2937, 2220, 1752, 1448, 1391, 1368, 1222, 1109, 1039cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O, MW: 294.1467, 測定値 m/z: 294.1475

理論値 C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O, :C, 65.29; H, 7.53, 測定値 C, 64.82; H, 7.73

## 【0069】製造例 1 2

エチル 2-メトキシ-2-エトキシカルボニル-3-ヘプチノエートジエチルケトマロナート(0.76ml, 5mmol)の無水テトラヒドロフラン(10ml)溶液に、1-ペンチン(0.49ml, 5mmol)とn-ブチルリチウム(1.61M)のヘキサン溶液(3.11ml, 5mmol)を0°Cで30分間反応させて調製したリチウム-プロピルアセチリドの無水テトラヒドロフラン(20ml)溶液を窒素雰囲気下、-78°Cにて滴下した。2時間後、ジメチル硫酸(0.47ml, 5mmol)を滴下した後、反応液を室温まで1時間かけて昇温し、次いで加熱還流した。3.5時間後、反応液を室温まで冷却し、エーテル(80ml)で希釈した。得られたエーテル

層を水(30ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(30ml)、飽和食塩水(30ml)で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラ法(エーテル-n-ヘキサン(1:1))にて精製し、黄色油状の標記化合物(0.521g、収率41%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.01(3H, t, J=7.3Hz), 1.30(6H, t, J=7.1Hz), 1.50-1.72(2H, m), 2.30(2H, t, J=7.0Hz), 3.50(3H, s), 4.30(4H, q, J=7.1Hz);

10 <sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.39, 13.98, 20.82, 21.67, 54.10, 62.80, 71.96, 79.67, 90.92, 165.70;  
IR(neat) 2967, 2833, 2242, 1752, 1465, 1368, 1269, 1109, 1044cm<sup>-1</sup>

理論値 C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O, :C, 60.91; H, 7.87, 測定値 C, 60.61; H, 8.07

## 【0070】製造例 1 3

エチル 2-ヒドロキシ-2-エトキシカルボニル-4-p-トルイル-3-ブチノエートジエチルケトマロナート(0.46ml, 3mmol)の無水テトラヒドロフラン(10ml)溶液に、p-トリルアセチレン(0.46ml, 3mmol)とn-ブチルリチウム(1.63M)のヘキサン溶液(1.84ml, 3mmol)を0°Cで30分間反応させて調製したリチウム-p-トリルアセチリドの無水テトラヒドロフラン(15ml)溶液を窒素雰囲気下、-78°Cにて滴下した。2時間後、5%塩酸(4ml)を加えることによって、反応を終結させ、反応液を室温まで昇温させ、エーテル(50ml)で希釈した。得られたエーテル層を水(20ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(20ml)、飽和食塩水(20ml)で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して得られた黄色油状物(0.893g)をカラムクロマトグラ法(エーテル-n-ヘキサン(1:1))にて精製し、黄色固体の標記化合物(0.635g、収率73%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.34(6H, t, J=7.1Hz), 2.35(3H, s), 4.20(1H, s), 4.36(4H, q, J=7.2Hz), 7.11(2H, AB, J<sub>AB</sub>=8.1Hz), 7.36(2H, AB, J<sub>AB</sub>=8.1Hz);

10 <sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.88, 21.47, 63.59, 66.74, 72.96, 81.94, 118.35, 129.96, 131.95, 139.34, 167.26;  
IR(KBr) 3467, 2983, 2238, 1757, 1511, 1450, 1369, 1264, 1228, 1104, 1064, 1026cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O, MW: 290.1154, 測定値 m/z: 290.1151

## 【0071】製造例 1 4

エチル 2-ヒドロキシ-2-エトキシカルボニル-4-フェニル-3-ブチノエートジエチルケトマロナート(0.46ml, 3mmol)の無水テトラヒドロフラン(10ml)溶液に、フェニルアセチレン(0.33ml, 3mmol)とn-ブチルリチウム(1.63M)のヘキサン溶液(1.84ml, 3mmol)を0°Cで30分間反応させて調製したリチウム-フェニルアセチリドの無水テト

ラヒドロフラン (15ml) 溶液を窒素雰囲気下、-78°C にて滴下した。2時間後、5% 塩酸 (4ml) を加えることによって、反応を終結させ、反応液を室温まで昇温させ、エーテル (50ml) で希釈した。得られたエーテル層を水 (20ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20ml)、飽和食塩水 (20ml) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフ法 (エーテル-n-ヘキサン (1:1)) にて精製し、黄色油状の標記化合物 (0.572g、収率69%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.34(6H, t, J=7.1Hz), 4.23(1H, s), 4.36(4H, q, J=7.1Hz), 7.26-7.35(3H, m), 7.46-7.52(2H, m);

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.89, 63.65, 72.94, 82.64, 86.50, 121.43, 128.22, 129.11, 132.05, 167.19; IR(KBr) 3468, 2985, 2238, 1747, 1491, 1445, 1369, 1216, 1107, 1071, 1024cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> MW:276.0998, 測定値 m/z:276.0979

理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> : C, 65.21; H, 5.84, 測定値 C, 64.88; H, 5.98

#### 【0072】製造例15

エチル 2-ヒドロキシ-2-エトキシカルボニル-4-(1-シクロヘキセン-1-イル)-3-ブチノエート

ジエチルケトマロナート (0.15ml, 1mmol) の無水テトラヒドロフラン (10ml) 溶液に、1-シクロヘキセン-1-イルアセチレン (0.12ml, 1mmol) と n-ブチルリチウム (1.63M) のヘキサン溶液 (0.61ml, 1mmol) を 0°C で 30 分間反応させて調製したリチウム-1-シクロヘキシルアセチリドの無水テトラヒドロフラン (5ml) 溶液を窒素雰囲気下、-78°C にて滴下した。2時間後、5% 塩酸 (4ml) を加えることによって、反応を終結させ、反応液を室温まで昇温させ、エーテル (50ml) で希釈した。得られたエーテル層を水 (20ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20ml)、飽和食塩水 (20ml) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフ法 (エーテル-n-ヘキサン (1:1)) にて精製し、黄色油状の標記化合物 (0.188g、収率67%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.32(6H, t, J=7.1Hz), 1.43-1.72(4H, m), 2.05-2.18(4H, m), 4.09(1H, s), 4.33(4H, q, J=7.1Hz), 6.20-6.26(1H, m);

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.92, 21.35, 22.12, 25.67, 28.61, 63.51, 72.96, 80.05, 88.51, 119.39, 137.56, 165.45; IR(neat) 3474, 2937, 2225, 1747, 1448, 1369, 1207, 1098, 1029cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> MW:280.1311, 測定値 m/z:280.1300

理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> : C, 64.26; H, 7.20, 測定値 C, 64.38; H, 7.50

40

#### 【0073】製造例16

エチル 2-ヒドロキシ-2-エトキシカルボニル-3-ブチノエート

ジエチルケトマロナート (0.15ml, 1mmol) の無水テトラヒドロフラン (10ml) 溶液に、1-ペンチン (0.1ml, 1mmol) と n-ブチルリチウム (1.63M) のヘキサン溶液 (0.61ml, 1mmol) を 0°C で 30 分間反応させて調製したリチウム-ブロビルアセチリドの無水テトラヒドロフラン (5ml) 溶液を窒素雰囲気下、-78°C にて滴下した。

2時間後、5% 塩酸 (4ml) を加えることによって、反応を終結させ、反応液を室温まで昇温させ、エーテル (50ml) で希釈した。得られたエーテル層を水 (20ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20ml)、飽和食塩水 (20ml) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフ法 (エーテル-n-ヘキサン (1:1)) にて精製し、黄色油状の標記化合物 (0.133g、収率55%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.00(3H, t, J=7.3Hz), 1.32(6H, t, J=7.1Hz), 2.00-2.20(2H, m), 2.26(2H, t, J=7.1Hz), 4.04(1H, s), 4.33(4H, q, J=7.1Hz);

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.35, 13.92, 20.75, 21.57, 63.47, 72.62, 74.29, 88.12, 165.59; IR(neat) 3475, 2967, 2245, 1747, 1466, 1369, 1269, 1176, 1094, 1028cm<sup>-1</sup>

理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> : C, 59.48; H, 7.49, 測定値 C, 59.13; H, 7.63

#### 【0074】製造例17

エチル 2-ヒドロキシ-2-エトキシカルボニル-4-トリメチルシリル-3-ブチノエート

ジエチルケトマロナート (0.46ml, 3mmol) の無水テトラヒドロフラン (10ml) 溶液に、トリメチルシリルアセチレン (0.42ml, 1mmol) と n-ブチルリチウム (1.63M) のヘキサン溶液 (1.84ml, 3mmol) を 0°C で 30 分間反応させて調製したリチウム-トリメチルシリルアセチリドの無水テトラヒドロフラン (15ml) 溶液を窒素雰囲気下、-78°C にて滴下した。2時間後、5% 塩酸 (4ml) を加えることによって、反応を終結させ、反応液を室温まで昇温させ、エーテル (50ml) で希釈した。得られたエーテル層を水 (20ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20ml)、飽和食塩水 (20ml) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフ法 (エーテル-n-ヘキサン (1:1)) にて精製し、黄色油状の標記化合物 (0.512g、収率63%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.20(9H, s), 1.32(6H, t, J=7.1Hz), 4.08(1H, s), 4.33(4H, q, J=7.1Hz); <sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -0.50, 13.81, 63.54, 72.72, 92.56, 97.90, 166.97;

IR(neat)3475, 2965, 2117, 1747, 1369, 1252, 1129, 1082, 10  
25cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>Si MW:272.1080, 測定値 m/z:2  
72.1100

理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>Si:C, 52.92; H, 7.41, 測定値 C, 52.69; H,  
7.61

#### 【0075】製造例18

エチル 2-(N-アセチル-N-メチルアミノ)-2-エトキシカルボニル-4-p-トルイル-3-ブチノエート

アセチルアミノトリフェニルホスフィン (0.320g、1.0mmol) を無水テトラヒドロフラン (8ml) に溶解し、室温にてジエチルケトマロナート (0.16ml、1.0mmol) を加え窒素雰囲気下攪拌した。得られた淡黄色の溶液を12時間加熱還流した後、-78°Cまで冷却した。次いでこの溶液に、p-トルイルアセチレン (0.13ml、1.0mmol) とn-ブチルリチウム (1.61M) のヘキサン溶液 (0.65ml、1.0mmol) を0°Cで30分間反応させて調製したリチウム-p-トルイルアセチリドの無水テトラヒドロフラン (10ml) 溶液を加えた。3時間後、ジメチル硫酸 (0.01ml、1mmol) を滴下した後、反応液を室温まで1時間昇温させ、次いで加熱還流した。3時間後、反応液を室温まで冷却し、エーテル (50ml) で希釈した。得られたエーテル層を水 (20ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20ml)、飽和食塩水 (20ml) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して、得られた黄色油状物 (0.694g) をカラムクロマトグラフ法 (エーテル-n-ヘキサン (5:1)) にて精製し、黄色油状の標記化合物 (0.898g、収率54%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.31(6H, t, J=7.1Hz), 1.51-1.74(4H, m), 2.00-2.14(4H, m), 2.17(3H, s), 3.17(3H, s), 4.14-4.43(4H, m), 6.14-6.29(1H, m);

<sup>13</sup>CNMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.95, 21.31, 22.06, 22.48, 25.6  
20 6, 28.58, 34.43, 62.79, 67.70, 78.65, 90.61, 119.40, 137.5  
1, 164.82, 171.71;

IR(neat)2932, 2223, 1749, 1668, 1447, 1387, 1347, 1207, 10  
49cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> MW:335.1733 測定値 m/z:33  
5.1724

#### 【0077】製造例20

エチル 2-アセチルアミノ-2-エトキシカルボニル-6-(テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)-3-ヘキシノエート

アセチルイミノトリフェニルホスフィン (2.00g、6.2  
36mmol) を無水テトラヒドロフラン (30ml) に溶解し、室温にてジエチルケトマロナート (1.05ml、0.689mmol) を加え、窒素雰囲気下11時間加熱還流した。次いで2-(3-ブチニロキシ)-テトラヒドロ-2H-ピラン (1.16g、7.522mmol) を無水テトラヒドロフラン (30ml) に溶解し、n-ブチルリチウムの (1.64M) ヘキサン溶液 (4.58ml、7.522mmol) を加え、氷冷下30分間攪拌して調製したリチオ体溶液を先の反応溶液に-78°Cにて滴下し、3時間攪拌した。反応溶液に5%塩酸を加え、エーテルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、常法により処理することにより、得られた残渣をカラムクロマトグラフ法 (エーテル) にて精製し、黄色透明油状物質の標記化合物 (1.70g、収率74%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.29(6H, t, J=7.1Hz), 1.40-1.90  
(6H, m), 2.05(3H, s), 2.56(2H, t, J=7.3Hz), 3.45-3.65(2H,  
m), 3.75-3.95(2H, m), 4.25-4.40(4H, m), 4.60-4.70(1H,  
m), 6.92(1H, brs);

IR(neat)2942, 2254, 1752, 1687, 1500, 1369, 1200, 1123, 10  
34cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> MW:345.1576, 測定値 m/z:34  
5.1577

#### 【0076】製造例19

エチル 2-(N-アセチル-N-メチルアミノ)-2-エトキシカルボニル-4-(1-シクロヘキセン-1-イル)-3-ブチノエート

アセチルイミノトリフェニルホスフィン (1.597g、5mmol) を無水テトラヒドロフラン (8ml) に溶解し、室温にてジエチルケトマロナート (0.763ml、5mmol) を加え窒素雰囲気下攪拌した。得られた淡黄色の溶液を12時間加熱還流した後、-78°Cまで冷却した。次いでこ

50 の溶液に1-シクロヘキセン-1-イルアセチレン (0.71ml、6mmol) とn-ブチルリチウム (1.61M) のヘキサン溶液 (3.73ml、5mmol) を0°Cで30分間反応させて調製したリチウム-1-シクロヘキセニアセチリドの無水テトラヒドロフラン (20ml) 溶液を加えた。3時間後、ジメチル硫酸 (0.47ml、5mmol) を滴下した後、反応液を室温まで1時間昇温させ、次いで加熱還流した。3時間後、反応液を室温まで冷却し、エーテル (50ml) で希釈した。得られたエーテル層を水 (20ml)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20ml)、飽和食塩水 (20ml) で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。減圧濃縮して、得られた黄色油状物 (0.694g) をカラムクロマトグラフ法 (エーテル-n-ヘキサン (5:1)) にて精製し、黄色油状の標記化合物 (0.898g、収率54%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.29(6H, t, J=7.1Hz), 1.40-1.90  
(6H, m), 2.05(3H, s), 2.56(2H, t, J=7.3Hz), 3.45-3.65(2H,  
m), 3.75-3.95(2H, m), 4.25-4.40(4H, m), 4.60-4.70(1H,  
m), 6.92(1H, brs);

IR(neat)2942, 2254, 1752, 1687, 1500, 1369, 1200, 1123, 10  
34cm<sup>-1</sup>

## 【0078】製造例 21

エチル 2-アセチルアミノ-2-エトキシカルボニル-6-ヒドロキシ-3-ヘキシノエート

製造例 20 で得られた化合物を酢酸-テトラヒドロフラン-水 (4:2:1) 混合溶媒 (6ml) に溶解した後、45°C に加温し 3 時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、常法により処理することにより、得られた残渣をカラムクロマトグラフ法 (エーテル) にて精製し、無色透明油状物質の標記化合物 (69.4mg、収率90%) を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.30(6H, t, J=7.1Hz), 2.06(3H, s), 2.50(2H, t, J=6.1Hz), 2.60-2.80(1H, brs), 3.73(2H, t, J=6.1Hz), 4.32(4H, q, J=7.1Hz), 7.06(1H, brs);

IR(neat) 3650-2600, 2254, 1751, 1667, 1500, 1370, 1196, 1126cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> MW:285.1212, 測定値 m/e:285.1200(M<sup>+</sup>)

## 【0079】製造例 22

エチル 2-アセチルアミノ-6-(5-ジメチルアミノ-1-ナフタレンスルホニルオキシ)-2-エトキシカルボニル-3-ヘキシノエート

製造例 21 で得られた化合物 (44.6mg、0.516mmol) を無水テトラヒドロフラン (2ml) に溶解し、メチルリチウムの (1.14M) エーテル溶液 (137.1μl、0.171mmol) を加え、窒素雰囲気下 -7 8 °C で 30 分間攪拌した後、ダンシルクロリド (50.6mg、0.187mmol) を加え、室温にて 3 時間攪拌した。反応溶液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えエーテルで抽出後、常法により処理することにより、得られた残渣をカラムクロマトグラフ法 (エーテル) にて精製し、黄色透明油状物質の標記化合物 (33.5mg、収率41%) を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.26(6H, t, J=7.1Hz), 2.01(3H, s), 2.61(2H, t, J=7.4Hz), 2.90(3H, s), 4.06(2H, t, J=7.4Hz), 4.20-4.35(4H, m), 6.87(1H, brs), 7.22(1H, d, J=7.6Hz), 7.45-7.65(2H, m), 8.15-8.30(2H, m), 8.62(1H, d, J=8.5Hz);

IR(neat) 3416, 3016, 2261, 1751, 1687, 1482, 1361, 1272, 1175, 1013, 981cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S MW:518.1722, 測定値 m/e:518.1701(M<sup>+</sup>)

理論値 C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: C, 57.90; H, 5.83; N, 5.40, 測定値 C, 57.70; H, 5.90; N, 5.16

## 【0080】製造例 23

エチル 2-アセチルアミノ-6-(N<sub>α</sub>-t-ブトキシカルボニル-N'-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル-L-アルギニルオキシ)-2-エトキシカルボニル-3-ヘキシノエート

製造例 21 で得られた化合物 (95.0mg、0.333mmol) を無水塩化メチレン (3ml) に溶解し、N<sub>α</sub>-t-ブトキシカルボニル-N'-メチチレン-2-スルホニル-

L-アルギニン (167.2mg、0.366mmol)、及び4-ジメチルアミノピリジン (4.07mg、0.033mmol)、ジシクロカルボジイミド (75.6mg、0.366mmol) を加え、氷冷下 2 時間攪拌した。析出したジシクロヘキシルウレア (DCUrea) をろ過除去し、ろ液を 5% 塩酸及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、常法により処理することにより、得られた残渣をカラムクロマトグラフ法 (ヘキサン-酢酸エチル (1:4)) にて精製し、白色粉末 (アモルファス) の標記化合物 (198mg、収率82%) を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.26(6H, t, J=7.1Hz), 1.44(9H, s), 1.50-2.00(4H, m), 2.07(3H, s), 2.26(3H, s), 2.51(2H, t, J=5.7Hz), 2.69(6H, s), 3.10-3.45(2H, m), 3.90-4.45(7H, m), 5.10-5.25(1H, brd), 6.05-6.15(1H, brs), 6.34(2H, brs), 6.88(2H, s), 7.12(1H, brs);

IR(neat) 3408, 3032, 3011, 2254, 1747, 1709, 1620, 1556, 1500, 1370, 1163, 1124cm<sup>-1</sup>

## 【0081】製造例 24

エチル 2-アセチルアミノ-2-エトキシカルボニル-6-(N'-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル-L-アルギニルオキシ)-3-ヘキシノエート 塩酸塩

製造例 23 で得られた化合物 (1.56g、2.155mmol) をトリフルオロ酢酸 (10ml) に溶解し、氷冷下 2 時間攪拌した後、トリフルオロ酢酸を減圧下に留去した。得られた残渣を 4 N 塩酸ジオキサン溶液 (10ml) に溶解し室温にて 1 時間攪拌後、エーテルを加えて結晶化させ、さらにエーテルで繰り返し洗浄することにより、白色粉末の標記化合物 (1.58g、収率100%) を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1.25(6H, t, J=7.1Hz), 1.50-2.00(4H, m), 2.03(3H, s), 2.31(3H, s), 2.67(6H, s), 2.55-2.80(2H, m), 3.20-3.45(2H, m), 4.05-4.45(7H, m), 7.00-7.10(2H, brs);

IR(KBr) 3650-2550, 2260, 1752, 1672, 1553, 1370, 1269, 1201, 1166, 1124, 1073cm<sup>-1</sup>

FABMS 理論値 C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S MW:624(M<sup>+</sup>·HCl+H), 測定値 m/e:624(M<sup>+</sup>·HCl+H)

## 【0082】製造例 25

エチル 2-アセチルアミノ-6-L-アルギニルオキシ-2-エトキシカルボニル-3-ヘキシノエート 2 塩酸塩

製造例 24 で得られた化合物 (150mg、0.204mmol) をトリフルオロ酢酸 (3ml) に溶解し、チオアニソール (1.2ml、10.21mmol) を加え、室温にて 72 時間攪拌した後、トリフルオロ酢酸を減圧下に留去した。得られた残渣を 4 N 塩酸ジオキサン溶液 (4ml) に溶解し室温にて 30 分間攪拌後、エーテルを加えて生じた沈澱物をエーテルで繰り返し洗浄した。さらにSephadex HL-20 (メタノール) を用いてゲルろ過し、エーテルを加えて結晶化することにより、白色粉末の標記化合物 (83.3mg、収率79%) を得た。

%)を得た。

融点: 85~89°C

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1.26(3H, t, J=7.1Hz), 1.70-2.20(4H, m), 2.03(3H, s), 2.68(2H, t, J=5.9Hz), 3.20-3.45(2H, m), 4.05-4.45(7H, m);

IR(KBr)3800-2400, 2254, 1752, 1667, 1520, 1371, 1203, 1127, 1011cm<sup>-1</sup>

FABMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MW:442(M<sup>+</sup>·2HCl+H), 測定値 m/e:442(M<sup>+</sup>·2HCl+H)

#### 【0083】製造例26

エチル 2-アセチルアミノ-6-(t-ブトキシカルボニル-L-フェニルアラニル-N'-2, 3, 6-tリメチルベンゼンスルホニル-L-アルギニルオキシ)-2-エトキシカルボニル-3-ヘキシノエート  
製造例24で得られた化合物(270mg、0.408mmol)とt-ブトキシカルボニル-L-フェニルアラニン(130.1mg、0.490mmol)を無水ジメチルホルムアミド(4ml)に溶解し、氷冷下、N-メチルモルホリン(53.9μl、0.490mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(66.2mg、0.490mmol)及びジンクロヘキシルカルボジイミド(92.7mg、0.449mmol)を順次加え、同温にて3時間攪拌した。さらに室温にて26時間攪拌した後、生じた沈澱物をろ過除去し、ろ液を10%クエン酸水溶液、5%炭酸水素ナトリウム水溶液、水順で洗浄した。さらに常法により処理することにより、得られた残渣をカラムクロマトグラフ法(ヘキサン-酢酸エチル(1:5))にて精製し、白色粉末(アモルファス)の標記化合物(267.4mg、収率75%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.26(6H, t, J=7.1Hz), 1.39(9H, s), 1.30-2.00(2H, m), 2.05(3H, s), 2.25(3H, s), 2.51(2H, brt), 2.69(6H, s), 2.95-3.40(4H, m), 4.00-4.65(8H, m), 5.00-5.15(1H, brd), 6.11(1H, brs), 6.32(2H, brd), 6.70-6.90(1H, brs), 6.88(2H, s), 7.10-7.30(5H, m);  
IR(neat)3411, 3025, 3019, 3010, 2257, 1747, 1677, 1620, 1556, 1496, 1274, 1215, 1199, 1166, 1124, 1014cm<sup>-1</sup>

FABMS 理論値 C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S MW:871(M<sup>+</sup>+H), 測定値 m/e: 871(M<sup>+</sup>+H)

#### 【0084】製造例27

エチル 2-アセチルアミノ-6-(N<sub>α</sub>-t-ブトキシカルボニル-N'-2, 3, 6-tリメチルベンゼンスルホニル-L-アルギニル-N'-2, 3, 6-tリメチルベンゼンスルホニル-L-アルギニルオキシ)-2-エトキシカルボニル-3-ヘキシノエート  
製造例24で得られた化合物を製造例26と同様な方法に付し、白色粉末(アモルファス)の標記化合物(収率64%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.20-1.30(6H, m), 1.40(9H, s), 1.50-2.00(8H, m), 2.05(3H, s), 2.26(6H, s), 2.55(2H, t, J=6.3Hz), 2.64(6H, s), 2.65(6H, s), 3.10-3.40(4H, m), 4.05-4.60(8H, m), 5.60-5.70(1H, brd), 6.10-6.50(6H, brt), 6.88

(4H, s), 7.24(1H, brs), 7.35-7.45(1H, brd);  
IR(CHCl<sub>3</sub>) 3356, 3019, 2256, 1747, 1673, 1622, 1555, 1391, 1271, 1216, 1166, 1122, 1055cm<sup>-1</sup>

FABMS 理論値 C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S MW:1062(M<sup>+</sup>+H), 測定値 m/e:1063(M<sup>+</sup>+H)

#### 【0085】製造例28

エチル 2-アセチルアミノ-2-エトキシカルボニル-6-(L-フェニルアラニル-L-アルギニルオキシ)-3-ヘキシノエート 2 塩酸塩

10 製造例26で得られた化合物を製造例25と同様な方法に付し、白色粉末の標記化合物(収率90%)を得た。

融点: 115~118°C

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1.26(6H, t, J=7.1Hz), 1.60-2.05(4H, m), 2.02(3H, s), 2.59(2H, t, J=6.4Hz), 3.00-3.30(4H, m), 4.10-4.35(7H, m), 4.45-4.55(1H, m), 7.25-7.40(5H, m);

IR(KBr)3700-2400, 2258, 1751, 1668, 1510, 1268, 1198, 1128cm<sup>-1</sup>

FABMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MW:589(M<sup>+</sup>·2HCl+H), 測定値 m/e:589(M<sup>+</sup>·2HCl+H)

#### 【0086】製造例29

エチル 2-アセチルアミノ-6-(L-アルギニル-L-アルギニルオキシ)-2-エトキシカルボニル-3-ヘキシノエート 3 塩酸塩

製造例27で得られた化合物を製造例25と同様な方法に付し、白色粉末の標記化合物(収率92%)を得た。

融点: 136~139°C

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1.26(3H, t, J=7.1Hz), 1.70-2.10(8H, m), 2.03(3H, s), 2.62(2H, t, J=6.4Hz), 3.15-3.35(4H, m), 4.10-4.45(8H, m);

IR(KBr)3700-2400, 2361, 2258, 1748, 1667, 1510, 1371, 1270, 1201, 1127cm<sup>-1</sup>

FABMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MW:598(M<sup>+</sup>·3HCl+H), 測定値 m/e:598(M<sup>+</sup>·3HCl+H)

#### 【0087】製造例30

エチル 2-t-ブトキシカルボキサミド-2-エトキシカルボニル-3-ヘプチノエート  
t-ブトキシカルボニルイミノトリフェニルfosfinを製造例20と同様な方法に付し、黄色透明油状の標記化合物(収率77%)を得た。

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.98(3H, t, J=7.3Hz), 1.29(6H, t, J=7.1Hz), 1.45(9H, s), 1.50-1.70(2H, m), 2.23(2H, t, J=7.1Hz), 4.15-4.45(4H, m), 5.90-7.05(1H, brs);  
IR(neat)3435, 2979, 2937, 2246, 1724, 1477, 1393, 1368, 1256, 1168, 1023cm<sup>-1</sup>

HRMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MW:341.1916(M<sup>+</sup>+H), 測定値 m/e:341.1919(M<sup>+</sup>+H)

#### 【0088】製造例31

エチル 2-アミノ-2-エトキシカルボニル-3-ヘプチノエート

製造例 3 0 で得られた化合物 (2.08g、6.092mmol) に 4 N 塩酸ジオキサン溶液 (30ml) を加え、氷冷下 10 分間攪拌した後、室温で 1 時間攪拌し、n-ヘキサンを加えて生じた沈澱物を n-ヘキサンで繰り返し洗浄した。さらにカラムクロマトグラフ法 (塩化メチレン-メタノール (20:1)) にて精製し、黄色透明油状の標記化合物 (1.40g、収率95%) を得た。

<sup>1</sup> HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.99(3H, t, J=7.3Hz), 1.30(6H, t, J=7.1Hz), 1.45-1.70(2H, m), 2.23(2H, t, J=7.1Hz), 2.15-2.35(2H, brs), 4.28(4H, q, J=7.1Hz);  
IR(neat)3393, 3324, 2967, 2938, 2254, 1747, 1585, 1239, 1096, 1028cm<sup>-1</sup>

FRBMS 理論値 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> MW:242(M<sup>+</sup>+H), 測定値 m/e:242 (M<sup>+</sup>+H)

【 0 0 8 9 】 製造例 3 2

エチル 2-(N<sub>α</sub>-t-ブトキシカルボニル-N'-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル-L-アルギニルアミノ)-2-エトキシカルボニル-3-ヘプチノエート

製造例 3 1 で得られた化合物 (124mg、0.514mmol) と N<sub>α</sub>-t-ブトキシカルボニル-N'-メシチレン-2-スルホニル-L-アルギニン (281.6mg、0.617mmol) を無水ジメチルホルムアミド (4ml) に溶解し、氷冷下、N-メチルモルホリン (67.8μl、0.617mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (83.3mg、0.617mmol) 及び 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (136.7mg、0.714mmol) を順次加え、同温にて 3 時間攪拌した。さらに室温にて 22 時間攪拌した後、酢酸エチルを加え、10% クエン酸水溶液、5% 炭酸水素ナトリウム水溶液、水順で洗浄した。さらに常法により処理することにより、得られた残渣をカラムクロマトグラフ法 (ヘキサン-酢酸エチル (2:5)) にて精製し、白色粉末 (アモルファス) の標記化合物 (189.0mg、収率54%) を得た。

<sup>1</sup> HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.91(3H, t, J=7.3Hz), 1.27(6H, t, J=7.1Hz), 1.43(9H, s), 1.35-2.00(6H, m), 2.14(2H, t, J=7.1Hz), 2.26(3H, s), 2.67(6H, s), 3.10-3.40(2H, m), 4.27(4H, q, J=7.1Hz), 5.30-5.50(1H, brd), 5.95-6.15(1H, brs), 6.28(2H, brd), 6.88(2H, s), 7.60-7.75(1H, brs);

IR(CHCl<sub>3</sub>)3600-3100, 3019, 2247, 1749, 1687, 1621, 1556, 1495, 1370, 1271, 1219, 1165, 1122, 1053cm<sup>-1</sup>

FABMS 理論値 C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S MW:871(M<sup>+</sup>+H), 測定値 m/e:871(M<sup>+</sup>+H)

【 0 0 9 0 】 製造例 3 3

エチル 2-L-アルギニルアミノ-2-エトキシカルボニル-3-ヘプチノエート 2 塩酸塩

製造例 3 2 で得られた化合物を製造例 2 5 と同様な方法に付し、白色粉末の標記化合物 (収率65%) を得た。

融点: 120~122°C

<sup>1</sup> HNMR(200MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1.00(3H, t, J=7.1Hz), 1.29(6H, t,

J=7.1Hz), 1.40-1.65(2H, m), 1.65-2.10(4H, m), 2.21(2H, t, J=7.0Hz), 3.20-3.50(2H, m), 4.05-4.20(1H, m), 4.20-4.50(4H, m);  
IR(KBr)3800-2400, 2361, 2253, 1752, 1670, 1520, 1369, 1244, 1098cm<sup>-1</sup>

【 0 0 9 1 】 製造例 3 4

エチル 2-エトキシカルボニル-2-(N'-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル-L-アルギニルアミノ)-3-ヘプチノエート 塩酸塩

10 製造例 3 2 で得られた化合物を製造例 2 4 と同様な方法に付し、白色粉末の標記化合物 (収率100%) を得た。融点: 98~103°C

<sup>1</sup> HNMR(200MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0.99(3H, t, J=7.3Hz), 1.28(3H, t, J=7.1Hz), 1.29(3H, t, J=7.1Hz), 1.40-1.65(2H, m), 1.65-2.05(4H, m), 2.20(2H, t, J=6.8Hz), 2.32(3H, s), 2.67(6H, s), 3.25-3.40(2H, m), 4.05-4.20(1H, brt), 4.20-4.35(4H, m), 7.10(2H, s);

IR(KBr)3700-2400, 2361, 2255, 1752, 1673, 1622, 1558, 1368, 1269, 1190, 1167, 1118, 1043cm<sup>-1</sup>

20 FABMS 理論値 C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S MW:580(M<sup>+</sup>-HCl+H), 測定値 m/e:580(M<sup>+</sup>-HCl+H)

【 0 0 9 2 】 製造例 3 5

エチル 2-(t-ブトキシカルボニル-L-フェニルアラニル-N'-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル-L-アルギニルアミノ)-3-ヘプチノエート  
製造例 3 4 で得られた化合物を製造例 2 7 と同様な方法に付し、白色粉末 (アモルファス) の標記化合物 (収率87%) を得た。

<sup>1</sup> HNMR(200MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0.92(3H, t, J=7.3Hz), 1.27(6H, t, J=7.1Hz), 1.31(9H, s), 1.35-2.00(6H, m), 2.15(2H, t, J=7.1Hz), 2.26(3H, s), 2.67(6H, s), 2.80-3.00(1H, m), 3.05-3.30(2H, m), 4.28(4H, J=7.1Hz), 4.35-4.65(2H, m), 5.25-5.45(1H, brt), 6.00-6.20(1H, brs), 6.31(2H, brs), 6.88(2H, s), 7.10-7.35(6H, m), 7.86(1H, brs);

IR(CHCl<sub>3</sub>)3600-3100, 3019, 2248, 1751, 1693, 1621, 1557, 1497, 1370, 1270, 1209, 1166, 1122, 1053cm<sup>-1</sup>

【 0 0 9 3 】 製造例 3 6

エチル 2-(N<sub>α</sub>-t-ブトキシカルボニル-N'-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル-L-アルギニルアミノ)-2-エトキシカルボニル-3-ヘプチノエート

40 製造例 3 4 で得られた化合物を製造例 2 6 と同様な方法に付し、白色粉末 (アモルファス) の標記化合物 (収率90%) を得た。

<sup>1</sup> HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.84(3H, t, J=7.3Hz), 1.22(3H, t, J=7.1Hz), 1.24(3H, t, J=7.1Hz), 1.40(9H, s), 1.25-1.95(10H, m), 2.00(2H, brt), 2.26(6H, s), 2.64(6H, s), 2.68(6H, s), 3.05-3.20(4H, m), 4.22(4H, q, J=7.1Hz), 4.30-4.60(2H, m), 5.45-5.70(1H, brs), 6.05-6.40(3H, brs), 6.40-6.70

(1H,brs), 6.87(2H,s), 6.89(2H,s), 7.50-7.70(1H,brd), 7.80(1H,brs);  
IR(CHCl<sub>3</sub>)3450, 3355, 3019, 2248, 1749, 1672, 1621, 1554, 1500, 1390, 1228, 1221, 1209, 1167, 1120, 1054cm<sup>-1</sup>

## 【0094】製造例37

エチル 2-エトキシカルボニル-2-(L-フェニルアラニル-L-アルギニルアミノ)-3-ヘプチノエート 2塩酸塩

製造例35で得られた化合物を製造例28と同様な方法に付し、白色粉末の標記化合物（収率60%）を得た。

融点：125～129°C

<sup>1</sup>HNMR(200MHz,CD,OD)δ 0.98(3H,t,J=7.3Hz), 1.27(6H,t,J=7.1Hz), 1.35-2.00(6H,m), 2.20(2H,t,J=6.8Hz), 2.90-3.10(1H,m), 3.10-3.30(1H,m), 4.27(4H,q,J=7.1Hz), 4.10-4.35(1H,m), 4.55-4.65(1H,m), 7.20-7.45(5H,m);  
IR(KBr)3800-2400, 2362, 1752, 1668, 1500, 1369, 1237, 1097cm<sup>-1</sup>

## 【0095】製造例38

エチル 2-(L-アルギニル-L-アルギニルアミノ)-2-エトキシカルボニル-3-ヘプチノエート 3塩酸塩

製造例36で得られた化合物を製造例29と同様な方法に付し、白色粉末の標記化合物（収率98%）を得た。

融点：145～148°C

<sup>1</sup>HNMR(200MHz,CD,OD)δ 0.98(3H,t,J=6.8Hz), 1.27(3H,t,J=7.1Hz), 1.40-2.10(10H,m), 2.20(2H,t,J=6.8Hz), 3.10-3.40(4H,m), 4.00-4.40(5H,m), 4.40-4.65(1H,m);  
IR(KBr)3800-2400, 3182, 2247, 1751, 1668, 1509, 1369, 1238, 1098cm<sup>-1</sup>

【0096】このようにして得られた2-アルキニルマロン酸誘導体を含有する医薬は、通常の製剤化方法によって、経口投与のための固体製剤、液体製剤又は非経口投与のための注射剤、坐剤等の各種製剤となすことができる。投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法により異なるが、通常1日1回～数回あるいは期間をおいて数日乃至週に一度、成人一人あたり0.1mg～500mgの範囲で経口投与されるか、又は成人一人あたり0.02mg～100mgの範囲で非経口投与される。経口投与のための固体組成物においては、ひとつ又はそれ以上の活性物質が、少なくともひとつの不活性な希釈剤と混合して用いられ、必要に応じて賦形剤、結合剤、潤滑剤、崩壊剤、溶解補助剤や安定化剤等を含有してもよい。錠剤又は丸剤は、必要に応じ胃溶性又は腸溶性物質フィルムで被膜してもよい。カプセル剤にはハードカプセル及びソフトカプセルが含まれる。経口投与のための液体組成物としては、溶液剤、乳濁剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤が含まれる。このような液体組成物においては、一般的に用いられる不活性な希釈剤が含まれ、それ以外に、湿潤剤、懸濁剤のような補助

剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてよい。非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤が含まれる。このような注射剤においては、ひとつ又はそれ以上の活性物質が、少なくともひとつの不活性の水性の希釈剤や不活性な非水性の希釈剤と混合して用いられ、必要に応じて、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解補助剤のような補助剤を含有していてよい。これらは通常、濾過（バクテリア保留フィルター等）、殺菌剤の配合又はガンマ線照射によって無菌化されるか、又はこれらの処理をした後、凍結乾燥等の方法により固体組成物とし、使用直前に無菌水、又は無菌の注射用希釈剤を加えて使用される。あるいはそのまま液状で用いてよい。次に、実施例を以て、より具体的な製剤化方法、試験方法及びその結果について述べる。

## 【0097】

## 【実施例】

## 1. 製剤例

## (カプセル剤)

|              |       |
|--------------|-------|
| 製造例2の化合物     | 100mg |
| 乳糖           | 103mg |
| トウモロコシデンプン   | 75mg  |
| ステアリン酸マグネシウム | 2mg   |

計280mg

上記処方の粉末を混合し、60メッシュの篩いを通して、この粉末280mgを3号ゼラチンカプセルに入れてカプセル剤とした。

## (錠剤)

|              |      |
|--------------|------|
| 製造例2の化合物     | 52mg |
| 微結晶セルロース     | 49mg |
| トウモロコシデンプン   | 48mg |
| ステアリン酸マグネシウム | 1mg  |

計150mg

化合物52mgと、微結晶セルロース49mgと、トウモロコシデンプンの一部を混合し、常法により粒状化した。得られた粒状物を篩いに通した後、残りのトウモロコシデンプン及びステアリン酸マグネシウムを加えて混合した。次いで、得られた粒状物を打錠機を用いて150mgの錠剤とした。

## (注射剤)

|          |            |
|----------|------------|
| 製造例2の化合物 | 5mg        |
| ブドウ糖     | 1g         |
| 注射用蒸留水   | 加えて全量 20ml |

計20ml

上記配合比で薬物を注射用蒸留水に溶解し、除塵、除菌、濾過をする。濾過した薬液を洗浄、乾燥、滅菌したアンプルに充填して注射剤とした。

## 【0098】

【試験例】次に本発明化合物がチオールプロテアーゼを抑制することを実証するため以下の試験を行った。

## 試験例1

## (1) 酵素の準備

ヒト組換カテブシンLは、公知の手法に従って形質転換マウスミエノーマ細胞の培養培地から得た〔例えば、掛川、勝沼他、J.Bio.Chem., Vol.88, No.6, 1805~1811(1980)〕。形質転換マウスミエノーマ細胞は、ヒト腎カテブシンL遺伝子のクローニングによって増殖されたcDNAフラグメントからなるプラスミドを用いたトランسفエクションによって調整した。培地中で発現されたヒト組換カテブシンLは、硫酸アンモニウム沈降法により、またセファデックスG-50、S-セファローゼ及びHPLC TSKG3000Sを用いたクロマトグラフィーによって完全に精製した。

## 【0099】(2) カテブシンL阻害活性の測定

カテブシンLの阻害活性の測定は、AJ.Bannet及びH.Kinschkeの方法〔Methods Enzymol., Vol.80.534~561(1982)〕に従って人工基質(MCA)を用いた蛍光法により行った。基質であるZ-Phe-Arg-MCAは加水分解されることによって、7-アミノ-4-メチルクマリンを放出する。この物質は、モノクロロ酢酸を用いて反応が停止された後、その強い蛍光によって計測される。測定は、50mM酢酸ナトリウム緩衝液中、pH 5.5でEDTA Na<sub>2</sub>(1mM)と、基質としてのZ-Phe-Arg-MCA(20μM, 蛋白研究所(大阪)から購入)を用いて行った。阻害剤は、酵素とともに37°Cで20分間ブレインキュベートされた。更に該反応混合物は基質とともに37°Cで20分間インキュベ

10

20

30

ートされた。基質の加水分解はpH 4.3で100mM酢酸ナトリウム緩衝液中に100mMモノクロロ酢酸を添加することにより停止された。酵素活性は、0.5単位に調整された(ここで、酵素活性の1単位とは、37°Cで1分間に1nmolの7-アミノ-4-メチルクマリン遊離をもって定義される。)基質から遊離された7-アミノ-4-メチルクマリンの蛍光は日立蛍光分析器(モデルF-2000)でモニターされた。460nmにおける放射は、370nmにおける励起をもって測定された。これらの試験結果を表5に示す。また、システィンを添加した場合の阻害活性試験の結果を表6に示す。

## 【0100】

## 【表5】

表5 ヒト組換カテブシンLの阻害活性(1)

| 処理       | 濃度(M)            | 加水分解活性(mU/ml) | 阻害率(%) |
|----------|------------------|---------------|--------|
| コントロール   | -                | 98.8          | -      |
| 製造例2の化合物 | 10 <sup>-6</sup> | 88.6          | 10.3   |
|          | 10 <sup>-5</sup> | 61.6          | 37.7   |
|          | 10 <sup>-4</sup> | 11.6          | 88.3   |

## 【0101】

## 【表6】

表6 ヒト組換カテブシンLの阻害活性(2)

| 処理  | 加水分解活性(mU/ml) |
|---|---------------|
| 酵素  | 94.2          |
| 酵素+製造例2の化合物(10 <sup>-4</sup> M)                             | 12.2          |
| 酵素+システィン(2×10 <sup>-3</sup> M)                              | 818.0         |
| 酵素+システィン(2×10 <sup>-3</sup> M)+製造例2の化合物(10 <sup>-4</sup> M) | 814.6         |

【0102】表5から明かなように、対照では98.8mU/mlが分解してしまったのに対し、本発明に係わる2-アルキニルマロン酸エステル誘導体の10<sup>-4</sup>M濃

50

度を用いることにより、加水分解は88.3%抑制された。また、表3の試験結果から明かなように、システィンを添加することによって、本発明に係わる化合物の阻

害活性が消失することから、これら化合物がSHアセプターとして機能していること、即ち、カテプシンLの活性中心部のチオール基と反応してカテプシンLの活性を阻害していることが明かである。

【0103】(3) カテプシンB阻害活性の測定

カテプシンB阻害活性はBarrettらの方法に従って測定した。ヒト肝カテプシンB(0.5単位;Athens Research and Technology)とシスティン塩酸塩(8mM)及びジメチルスルホキシドに溶解した阻害剤をEDTA-2Na(1mM)を含有した50mM酢酸緩衝液中にて混合させ、37°Cで30分間、ブレインキュベーションした後、Z-Phe-Arg-MCA(20μM)を加えて反応を開始した。37°Cで20分間、反応させた後、100mMモノクロロ酢酸ナトリウム溶液(pH4.3)を加えて反応を停止し、反応液の蛍光強度(励起波長:370nm、蛍光波長:460nm)を測定した。結果は、阻害剤を加えない場合の蛍光強度から下記の式より算出した阻害率で示した。

0分間、ブレインキュベーションした後、Z-Phe-Arg-MCA(20μM)を加えて反応を開始した。37°Cで20分間、反応させた後、100mMモノクロロ酢酸ナトリウム溶液(pH4.3)を加えて反応を停止し、反応液の蛍光強度(励起波長:370nm、蛍光波長:460nm)を測定した。結果は、阻害剤を加えない場合の蛍光強度から下記の式より算出した阻害率で示した。

【0104】

【数1】

含有した50mM酢酸緩衝液中にて混合させ、37°Cで30分間、ブレインキュベーションした後、Z-Phe-Arg-MCA(20μM)を加えて反応を開始した。37°Cで20分間、反応させた後、100mMモノクロロ酢酸ナトリウム溶液(pH4.3)を加えて反応を停止し、反応液の蛍光強度(励起波長:370nm、蛍光波長:460nm)を測定した。結果は、阻害剤を加えない場合の蛍光強度から下記の式より算出した阻害率で示した。

阻害率(%) =

阻害剤を加えない場合の蛍光強度 - 阻害剤を加えた場合の蛍光強度

× 100

阻害剤を加えない場合の蛍光強度

【0105】この結果を下記表7乃至表9に示す。

【表7】

【0106】

表7 カテプシンBの阻害活性

| 化合物番号 | 濃度(M)              | 阻害率(%) | 製造例番号 | 濃度(M)              | 阻害率(%) |
|-------|--------------------|--------|-------|--------------------|--------|
| 1     | $1 \times 10^{-5}$ | 20.4   | 7     | $1 \times 10^{-5}$ | 32.9   |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 48.1   |       | $1 \times 10^{-4}$ | 82.9   |
| 2     | $1 \times 10^{-5}$ | 18.1   | 8     | $1 \times 10^{-5}$ | 45.3   |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 48.6   |       | $1 \times 10^{-4}$ | 80.8   |
| 3     | $1 \times 10^{-5}$ | 16.5   | 9     | $1 \times 10^{-5}$ | 27.8   |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 42.7   |       | $1 \times 10^{-4}$ | 50.8   |
| 4     | $1 \times 10^{-5}$ | 38.0   | 11    | $1 \times 10^{-5}$ | 12.9   |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 65.4   |       | $1 \times 10^{-4}$ | 38.9   |
| 5     | $1 \times 10^{-5}$ | 10.4   | 12    | $1 \times 10^{-5}$ | 27.0   |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 12.6   |       | $1 \times 10^{-4}$ | 54.8   |
| 6     | $1 \times 10^{-5}$ | 15.8   | 13    | $1 \times 10^{-5}$ | 25.3   |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 38.2   |       | $1 \times 10^{-4}$ | 55.7   |

【0107】

【表8】

表8 カテブシBの阻害活性

| 化合物番号 | 濃度 (M)             | 阻害率 (%) | 製造例番号 | 濃度 (M)             | 阻害率 (%) |
|-------|--------------------|---------|-------|--------------------|---------|
| 16    | $1 \times 10^{-5}$ | 84.6    | 24    | $1 \times 10^{-5}$ | 35.7    |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 52.6    |       | $1 \times 10^{-4}$ | 46.7    |
| 18    | $1 \times 10^{-5}$ | 28.8    | 25    | $1 \times 10^{-5}$ | 8.9     |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 58.6    |       | $1 \times 10^{-4}$ | 29.2    |
| 18    | $1 \times 10^{-5}$ | 80.6    | 26    | $1 \times 10^{-5}$ | -4.8    |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 93.7    |       | $1 \times 10^{-4}$ | 13.9    |
| 20    | $1 \times 10^{-5}$ | 16.8    | 27    | $1 \times 10^{-5}$ | 1.7     |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 32.7    |       | $1 \times 10^{-4}$ | 39.6    |
| 21    | $1 \times 10^{-5}$ | 13.9    | 28    | $1 \times 10^{-5}$ | 5.9     |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 18.7    |       | $1 \times 10^{-4}$ | 14.3    |
| 23    | $1 \times 10^{-5}$ | 3.4     | 29    | $1 \times 10^{-5}$ | 18.2    |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 8.9     |       | $1 \times 10^{-4}$ | 23.0    |

【0108】

【表9】

表9 カテプシンBの阻害活性

| 化合物番号 | 濃度(M)              | 阻害率(%) | 製造例番号 | 濃度(M)              | 阻害率(%) |
|-------|--------------------|--------|-------|--------------------|--------|
| 30    | $1 \times 10^{-5}$ | 6.2    | 36    | $1 \times 10^{-5}$ | 34.8   |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 26.2   |       | $1 \times 10^{-4}$ | 55.0   |
| 31    | $1 \times 10^{-5}$ | 13.9   | 37    | $1 \times 10^{-5}$ | 6.2    |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 11.3   |       | $1 \times 10^{-4}$ | -32.0  |
| 32    | $1 \times 10^{-5}$ | 24.1   | 38    | $1 \times 10^{-5}$ | -10.1  |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 45.7   |       | $1 \times 10^{-4}$ | -30.4  |
| 33    | $1 \times 10^{-5}$ | 19.3   |       |                    |        |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | -6.8   |       |                    |        |
| 34    | $1 \times 10^{-5}$ | 25.1   |       |                    |        |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 22.7   |       |                    |        |
| 35    | $1 \times 10^{-5}$ | 28.0   |       |                    |        |
|       | $1 \times 10^{-4}$ | 37.0   |       |                    |        |

【0109】上記カテプシンB阻害活性試験の結果から明きらかなどおり、本発明のいずれの2-アルキニルマロン酸誘導体は優れたカテプシンB阻害活性を示し、とりわけ製造例4、7、8、15、18、24及び36の化合物は優れた活性を示した。従って、本発明の2-アルキニルマロン酸誘導体は優れたチオールプロテアーゼ阻害活性を有するものであり、チオールプロテアーゼ

30 が関与するとされる疾患、例えば筋ジストロフィー症、炎症、腎性高血圧症、白内障、心筋梗塞、ウイルス感染症、悪性腫瘍、アレルギー性疾患の予防、又は治療への効果が大いに期待され、とりわけコラーゲン分解能を阻害するという観点からして、骨粗鬆症治療剤及び高カルシウム血症治療剤として有用である。

フロントページの続き

| (51)Int.Cl.   | 識別記号      | 府内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
|---------------|-----------|---------|-----|--------|
| C 07 C 69/734 | Z 9279-4H |         |     |        |
| 219/22        |           |         |     |        |
| 229/24        |           | 7537-4H |     |        |
| 317/22        |           |         |     |        |
| C 07 K 5/065  |           |         |     |        |
| 5/068         | Z N A     | 8318-4H |     |        |
| 5/08          |           |         |     |        |